



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA**

**ANÁLISE DA CITOTOXICIDADE E GENOCITOTOXICIDADE DA *Aloe vera***  
**ASSOCIADA A MEDICAMENTO ENDODÔNTICO E**  
**FOTOBIMODULAÇÃO A LASER**

Aracaju/SE  
Novembro/2016

**NAYANE CHAGAS CARVALHO**

**ANÁLISE DA CITOTOXICIDADE E GENOCITOTOXICIDADE DA *Aloe vera*  
ASSOCIADA A MEDICAMENTO ENDODÔNTICO E  
FOTOBIOMODULAÇÃO A LASER**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Odontologia, da Universidade Federal de Sergipe, para obtenção do título de Mestre em Odontologia.

Orientadora: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Maria Amália Gonzaga Ribeiro.

Coorientadora: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Samira Esteves Afonso Camargo.

Aracaju/SE  
Novembro/2016

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA BIBLIOTECA CENTRAL  
UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE

C331a Carvalho, Nayane Chagas  
Análise da citotoxicidade e genocitotoxicidade da *Aloe vera* associada a medicamento endodôntico e fotobiomodulação a laser / Nayane Chagas Carvalho ; orientadora Maria Amália Gonzaga Ribeiro. – Aracaju, 2016.  
65 f.

Dissertação (mestrado em Odontologia) – Universidade Federal de Sergipe, 2016.

1. Endodontia. 2. Medicamentos. 3. Babosa (Planta). 4. Testes de toxicidade. I. Ribeiro, Maria Amália Gonzaga, orient. II. Título.

CDU 616.314.18

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA**

A comissão julgadora dos trabalhos de defesa de Dissertação de Mestrado, em sessão pública realizada em 02 de dezembro de 2016, considerou o(a) candidato(a) Nayane Chagas Carvalho aprovado(a).

1. Professor Dr. Ricardo Luiz Cavalcanti de Albuquerque Júnior.
2. Professor Dr. Thiago de Santana Santos.
3. Professora Dr<sup>a</sup>. Maria Amália Gonzaga Ribeiro.

## AGRADECIMENTOS

Mais um sonho se concretiza com amor, dedicação, esforço e, sem dúvidas deixará saudades. Não poderia deixar de agradecer àqueles que colaboraram para esse sonho se tornar realidade:

A Deus, pois sem Ele essa trajetória não seria possível. Sou grata por seu amor, proteção e onipresença. Contigo, tudo se torna mais fácil.

À minha querida mãe Acácia por sempre estar ao meu lado. Seu carinho, amor e apoio são essenciais para mim.

Ao meu paizinho Raimundo (*in memorian*) que permanecerá eternamente vivo dentro de mim. A saudade é uma luz que nunca se apaga!

Aos meus irmãos Mayana, Nayara, Mayara e Herbert pelo carinho, companheirismo e bagunças do bem.

Ao meu padrasto Antônio pelo incentivo e amizade.

Aos avós José Alves Chagas (*in memorian*) e Maria da Conceição, pelas orações, amor e ensinamentos fundamentais para esta caminhada.

Aos avós Francisca (*in memorian*) e José de Carvalho (*in memorian*) por toda a ternura jamais esquecida.

Aos meus familiares que me encorajaram e com muita certeza influenciaram para essa vitória.

Ao meu noivo Alysson por mostrar-me o verdadeiro significado do amor, carinho, paciência, respeito e cumplicidade.

A todos os integrantes do Programa de Pós-Graduação em Odontologia (PRODONTO) da Universidade Federal de Sergipe, em especial professor Paulo R.S.M. Filho e Maíra Santos, pela oportunidade e disponibilidade dos meios de pesquisa e educação que corroboraram para essa conquista.

À minha orientadora Maria Amália pela infinita disponibilidade, por ensinar-me que aprender é um exercício diário e sem limites. Não existem palavras que possam expressar meu carinho e admiração por você.

Ao professor Paulo Mesquita, pela disponibilidade, atenção e gentileza de ceder as amostras das plantas utilizadas para essa pesquisa.

À minha co-orientadora Samira Esteves pelos seus ensinamentos, pela paciência e colaboração inestimável.

Aos professores Adriano Antunes, Luiz Renato Paranhos, Thiago de Santana Santos, Ricardo Albuquerque, Juliana Cardoso que destinaram parte do seu precioso tempo para colaborar com esta pesquisa, pela competência, opiniões construtivas e apoio para que essa pesquisa pudesse ser realizada da melhor forma possível.

Aos professores Mirabeau Ramos, Marta Piva, Maria Helena e Alaíde Hermínia pelo afeto, companheirismo e apoio.

A todos colegas de sala pelo grande incentivo e por mostrar-me que a pesquisa científica se faz por amor à profissão e ao próximo.

Às auxiliares, acadêmicos e pacientes do Departamento de Odontologia que estiveram comigo nessa jornada, agradeço de coração por tudo o que vocês ofereceram para mim.

*"A única constante é a mudança."*

***Heráclito de Efeso***

## RESUMO

Este estudo objetiva avaliar *in vitro* o efeito da *Aloe vera* associada a medicamento de uso endodôntico combinados ou não a FTL em fibroblastos pulpare humanos FP6. Os grupos foram divididos em: CTR com meio de cultura com fibroblastos; CL, apenas FTL; AA, *Aloe vera* com água destilada; AL, *Aloe vera* com água destilada e FTL; HA, hidróxido de cálcio P.A. com água destilada; HL, hidróxido de cálcio P.A. com água destilada e FTL; HAA, hidróxido de cálcio P.A. com *Aloe vera* e água destilada; HAL, hidróxido de cálcio P.A. com *Aloe vera*, água destilada e FTL. A avaliação da citotoxicidade sucedeu-se com o reagente MTT em 24, 48 e 72 h e, para avaliação da genotoxicidade utilizou-se o teste de micronúcleo em 24 h. Em 24 h, o grupo CL apresentou a maior média de viabilidade celular, e o HA mostrou menor média mas estimulou maior número de divisão celular. Em 48 h, o grupo CL apresentou a maior média de viabilidade celular apesar da elevada genotoxicidade, e o HAL mostrou menor média. O grupo AL demonstrou maior percentual de células sobreviventes em 72 h com diferença estatística dos grupos HA e HL ( $p < 0,05$ ). O grupo AL exibiu alta genotoxicidade tendo resultados significantes quando em comparação com o grupo CTR ( $p < 0,001$ ) e ao grupo AA ( $p < 0,01$ ). Conclui-se que a *Aloe vera* permitiu uma maior viabilidade celular em fibroblastos pulpare humanos na presença do hidróxido de cálcio, contudo houve aumento da genotoxicidade nessa associação. Já o hidróxido de cálcio e a FTL apresentaram maior citotoxicidade.

Palavras-chave: *Aloe vera*; Citotoxicidade; Fotobiomodulação a laser; Genotoxicidade; Medicamentos endodônticos.



## ABSTRACT

This study aims to evaluate the effect of a drug in order to avoid the appearance of side effects of human pulp fibroblasts. The groups were divided into: CTR with culture medium with fibroblasts; CL, FTL only; AA, Aloe vera with distilled water; AL, Aloe vera with distilled water and FTL; HA, calcium hydroxide P.A. With distilled water; HL, calcium hydroxide P.A. With distilled water and FTL; HAA, calcium hydroxide P.A. With Aloe vera and distilled water; HAL, calcium hydroxide P.A. With Aloe vera, distilled water and FTL. Cytotoxicity evaluation was performed with the MTT reagent at 24, 48 and 72 h, for the evaluation of genotoxicity the micronucleus test was used in 24 h. At 24 h, the CL group presented a greater media of cellular viability, and the HA showed lower mean but stimulated greater number of cell division. At 48 h, the CL group presented a higher medium of cellular viability of high genotoxicity, and the HAL showed lower mean. The AL group showed a higher percentage of surviving cells in 72 h with statistic different from the HA and HL groups ( $p < 0.05$ ). ( $P < 0.001$ ) and to the AA group ( $p < 0.01$ ). The AL group exhibited high genotoxicity with significant results when the CTR group ( $p < 0.001$ ) and the AA group ( $p < 0.01$ ). It is concluded that Aloe vera allowed a greater cell viability in human pulp fibroblasts in the presence of calcium hydroxide, with the increase of the genotoxicity increase in this association. Calcium hydroxide and an FTL showed higher cytotoxicity.

Key words: *Aloe vera*; Cytotoxicity; Laser photobiomodulation; Genotoxicity; Endodontic drugs.

## SUMÁRIO

<b>1.</b>	<b>INTRODUÇÃO</b>	12
<b>2.</b>	<b>OBJETIVO</b>	14
2.1.	Objetivo geral	14
2.2.	Objetivos específicos	14
<b>3.</b>	<b>METODOLOGIA</b>	15
3.1.	Delineamento	15
3.2.	Procedimentos laboratoriais	15
3.2.1.	Descongelamento das células	15
3.2.2.	Divisão dos grupos experimentais	16
3.2.3.	Preparação do gel e liofilização da <i>Aloe vera</i>	17
3.2.4.	Parâmetros para Irradiação a laser	18
3.2.5.	Estudo da citotoxicidade	20
3.2.5.1.	Cultivo das células	20
3.2.5.2.	Plaqueamento	21
3.2.5.3.	Preparo dos corpos de provas e dos eluatos	22
3.2.5.4.	Contato das células com os eluatos	23
3.2.5.5.	Irradiação a laser	23
3.2.5.6.	Análise da citotoxicidade	24
3.2.6.	Estudo da genotoxicidade	25
3.2.6.1.	Cultivo celular e Plaqueamento	25
3.2.6.2.	Preparo dos corpos de provas e dos eluatos	26
3.2.6.3.	Contato das células com os eluatos	26
3.2.6.4.	Irradiação a laser	26
3.2.6.5.	Análise da genotoxicidade	26
3.3.	Análise estatística	27
<b>4.</b>	<b>RESULTADOS</b>	28
<b>5.</b>	<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS</b>	51
<b>6.</b>	<b>COMUNICADO DE IMPRESSA</b>	52

<b>REFERÊNCIAS</b>	54
<b>APÊNDICE I</b>	63

## 1. INTRODUÇÃO

A Endodontia consiste no tratamento dos sistemas de canais radiculares (SCR) por meio de etapas interdependentes, e, dentre as diferentes fases dessa terapia, destaca-se o preparo químico-cirúrgico, cujo intuito é eliminar ou diminuir ao máximo a quantidade de microorganismos patógenos, criando destarte, condições favoráveis para o reparo tecidual na região periapical, e, possibilitando que o elemento dental exerça suas funções no sistema estomatognático.

A exposição do complexo dentino-pulpar resultante de lesões cariosas ou traumática e as infecções endodônticas representam a principal causa de alterações pulpares e periapicais e, representam a principal via de infecção dos canais radiculares. A infecção no SCR e a composição da microbiota endodôntica são influenciadas por alguns fatores, tais como: a disponibilidade de oxigênio, o pH do ambiente, disponibilidade de nutrientes, interação bacteriana e o mecanismo de defesa do hospedeiro (Passos SM, 2014).

As medicações de uso endodôntico exercem um papel importante no combate dos patógenos presentes no SCR e criam condições favoráveis à reparação dos tecidos que compõem o periodonto. Da medicação espera-se que aumente o pH nos locais de contato direto com os túbulos dentinários levando a níveis neutros, assim como deve ser de amplo espectro para que atue de forma satisfatória em bactérias, fungos e vírus (Leonardo *et al.*, 1993).

Denomina-se citotoxicidade o efeito destrutivo de um material às células (Li Y, 1996), e genotoxicidade a detecção de danos ao material genético tais como quebra de DNA, mutação genética, quebra cromossômica e alteração na capacidade de reparo do DNA (Ribeiro *et al.*, 2006). Para justificar a aplicabilidade da medicação intracanal, essa deve apresentar alta atividade antimicrobiana, baixa citotoxicidade e genotoxicidade, objetivando atingir um potencial para eliminar as bactérias sem danificar os tecidos periapicais (Camargo *et al.*, 2009; Jahromi *et al.*, 2014).

A medicação padrão ouro na Endodontia é o hidróxido de cálcio que caracteriza-se por ser um pó branco, inodoro, biocompatível, com baixa solubilidade e utilidade por um período prolongado e necessário antes que se torne solubilizado quando em contato direto com fluidos de tecidos vitais (Tronstad *et al.*, 1981). Possui ação antibacteriana, antifúngica e atua combatendo o biofilme microbiano (Silva e Leal, 2012). Além disso, quando presente nos canais radiculares promove aumento do pH na superfície radicular interna, por meio de difusão de íons hidroxila,

sendo dessa forma um potente agente bactericida na desinfecção dos túbulos dentinários (Pallota *et al.*, 2007).

Outro recurso utilizado como coadjuvante na prática odontológica refere-se à fotobiomodulação a laser (FTL), a qual possui ação analgésica, anti-inflamatória, antiedematosa, auxiliando o processo de reparo tecidual (Xu *et al.*, 2010). Dentre os mecanismos que envolvem a atuação da terapia a laser, destacam-se: aumento da microcirculação local, angiogênese, vasodilatação e inibição de mediadores inflamatórios como prostaglandinas (Albertini *et al.*, 2007; Laraia *et al.*, 2012). A ação do laser evita o início da cascata do ácido araquidônico em tecidos lesados, levando à diminuição da produção de prostaglandinas (Mizutani *et al.*, 2004).

A utilização de produtos naturais em Odontologia tem sido justificada pelo uso popular, apresentando-se como uma alternativa de baixo custo, com atividades antimicrobiana e anti-inflamatória. Portanto, a combinação de recursos naturais com medicamentos de uso endodônticos deve ser avaliada, a fim de investigar novas possibilidades para o desenvolvimento de medicamentos intracanaais para posterior aplicação clínica (Cavalcanti *et al.*, 2010). Entre os produtos naturais que tem sido investigado na Odontologia, cita-se a *Aloe vera*, planta de origem africana pertencente à família das Liliáceas, do gênero *Aloe* e é usada medicinalmente há muito tempo (Ramos e Pimentel, 2011). Sendo assim, este estudo objetiva analisar a citotoxicidade e genotoxicidade da *Aloe vera* associada a medicamento de uso endodôntico combinados ou não a FTL em fibroblastos pulpaes humanos FP6.

## **2. OBJETIVO**

### **2.1 OBJETIVO GERAL**

- Avaliar *in vitro* o efeito da *Aloe vera* associada a medicamento de uso endodôntico combinados ou não a fotobiomodulação a laser (FTL) em fibroblastos pulpare de humanos FP6.

### **2.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Estudar a citotoxicidade da *Aloe vera* associada a medicamento de uso endodôntico combinados ou não a FTL em fibroblastos em 24, 48 e 72 h por meio do reagente MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio brometo).
- Estudar a genotoxicidade da *Aloe vera* associada a medicamento de uso endodôntico combinados ou não a FTL em fibroblastos em 24 h, por meio do teste de micronúcleo (*fluoroshield with DAPI*).

### **3. METODOLOGIA**

#### **3.1 Delineamento**

Trata-se de um estudo experimental, *in vitro* e quantitativo com *Aloe vera* associada a medicamento de uso endodôntico combinados ou não a FTL em fibroblastos pulpaes humanos FP6. A avaliação da citotoxicidade sucedeu-se com o reagente MTT em 24, 48 e 72 h e, para avaliação da genotoxicidade utilizou-se o teste de micronúcleo em 24 h. Esse estudo apresenta três variáveis independentes: FTL, medicação intracanal e o tempo experimental. A variável dependente é a viabilidade celular. Este estudo foi realizado em triplicata e os desfechos analisados foram percentual médio de viabilidade celular, quantificação a cada 1000 células de micronúcleos, apoptose e divisão celular.

#### **3.2 Procedimentos laboratoriais**

Toda a metodologia da pesquisa foi realizada de acordo com as normas da International Organization of Standardization (ISO) 10993-5: 2009 organização que padroniza os testes de citotoxicidade. Os procedimentos realizados necessitaram de ambiente estéril e execução dentro da câmara de fluxo laminar.

A linhagem de células permanentes fibroblásticas pulpar humana FP6 utilizada na pesquisa foi obtida no banco de células do Laboratório de Biologia Celular da UNESP - Universidade Estadual Paulista, Campus de São José dos Campos.

##### **3.2.1 Descongelamento das células**

Para o descongelamento das células FP6, os criotubos (Global Trade Technology, São Paulo, Brasil) foram colocados em banho-maria a 37°C por 1 min com 5 mL de solução salina estéril com a finalidade de diluir o Dimetilsulfóxido (DMSO) (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA), substância utilizada para congelar as células que em temperatura ambiente é tóxica para elas. Todo esse conteúdo foi colocado num tubo estéril tipo Falcon de 15 mL (Guangzhou Jet Bio-Filtration Products Co., Ltda., Guangdong, China) e centrifugado a uma temperatura de 4°C, em 1750 rpm por 10 min com o objetivo de separar as células do líquido sobrenadante. Essas foram aspiradas e suspensas novamente em 2mL de meio de cultura completo - DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium- LGC Biotecnologia, Cotia, Brasil) com L-glutamina

suplementado com 10% de soro SBF e 1% de Penicilina (10.000UI/mL)/ Estreptomicina (10mg/mL) (Cultilab Ltda, Campinas, SP, Brasil). Em seguida, todo o conteúdo do tubo Falcon foi transferido para o frasco de cultivo de células de 25cm<sup>2</sup> (50mL) (Greiner Bio-one, Americana, São Paulo, Brasil) e, com o objetivo de completá-lo, adicionou-se mais 3mL de meio de cultura completo. As células foram levadas a incubadora em atmosfera úmida a 37°C, com 5% CO<sub>2</sub> e 95% de ar, conforme preconizado por Gomes-Cornélio *et al.*, 2011.

### 3.2.2 Divisão dos grupos experimentais

A medicação intracanal analisada foi o hidróxido de cálcio P.A (Biodinâmica Química e Farmacêutica LTDA, PR, Brasil) com a *Aloe vera*, associada ou não a fotobiomodulação a laser, por ser a medicação intracanal mais utilizada na clínica endodôntica. O veículo selecionado para este experimento foi a água destilada (Eurofarma Laboratórios LTDA, SP, Brasil), por ser um veículo aquoso e biologicamente inativo. Para facilitar a análise, os grupos foram divididos conforme descrito no Quadro 1. A pasta da *Aloe vera* foi manipulada separadamente aos grupos na proporção de 200mg para 5mL e, acrescida as outras substâncias quando necessário. Em estudo piloto anterior (Júnior JP. "Análise do pH de pastas endodônticas associadas à *Aloe vera*". Trabalho de conclusão de curso de graduação em Odontologia. Universidade Federal de Sergipe. Aracaju/SE - Brasil. 2015), verificou-se a quantidade necessária de água destilada para dissolver todo o pó da *Aloe vera* e formar uma consistência de pasta.

Quadro1. Descrição dos grupos e das proporções das medicações intracanaís analisadas na pesquisa.

Grupos	Substâncias	Dosagem
<b>CTR</b> (Controle)	Meio de cultura com fibroblastos	200µL/poço
<b>CL</b>	FTL*	-
<b>AA</b>	<i>Aloe vera</i> Água destilada	200mg 5mL
<b>AL</b>	<i>Aloe vera</i> Água destilada FTL*	200mg 5mL
<b>HA</b>	Hidróxido de cálcio P.A. Água destilada	1g 1.1mL
<b>HL</b>	Hidróxido de cálcio P.A.	1g



	Água destilada FTL*	1.1mL
<b>HAA</b>	Hidróxido de cálcio P.A. Água destilada <i>Aloe vera</i>	1g 6.1mL 200mg
<b>HAL</b>	Hidróxido de cálcio P.A. Água destilada <i>Aloe vera</i> FTL*	1g 6.1mL 200mg

\*- fotobiomodulação a laser.

### 3.2.3 Preparação do gel e liofilização da *Aloe vera*

As folhas da *Aloe vera* foram adquiridas no estado de Sergipe, Brasil e levadas ao Departamento de Biologia da Universidade Federal de Sergipe (UFS) no setor herbário no qual passou por processo de identificação e adquirido o voucher de número ASE-37.261 (Figura 1). O gel da *Aloe vera* foi retirado das folhas com comprimento entre 25 a 30 cm, as quais foram cortadas a 5 cm do talo, lavadas em água corrente e mantidas em água destilada por 24 h (Fé *et al.*, 2014). O gel foi obtido por meio de raspagem do parênquima, filtrado, armazenado em coletor estéril enrolado em papel filme, levado ao freezer onde permaneceu até o congelamento em torno de -18° a - 25° (Figura 2). O gel mucilaginoso extraído da polpa da raiz conserva a umidade do tecido por longo período de tempo. Este gel tem sabor amargo, adstringente, muito forte, tendo um PH entre 4,0 e 5,0 (Gomes C, 2012).

Em seguida, toda amostra obtida das folhas de *Aloe vera* foi levada ao Departamento de Farmácia da Universidade Federal Sergipe, onde passou pelo processo de liofilização em que ocorre retirada toda a água do gel mucilaginoso no estado sólido diretamente para o estado gasoso restando somente parte sólida e, ocorre também a eliminação de qualquer tipo de micro-organismo.



Figura 1. Planta *Aloe vera*.

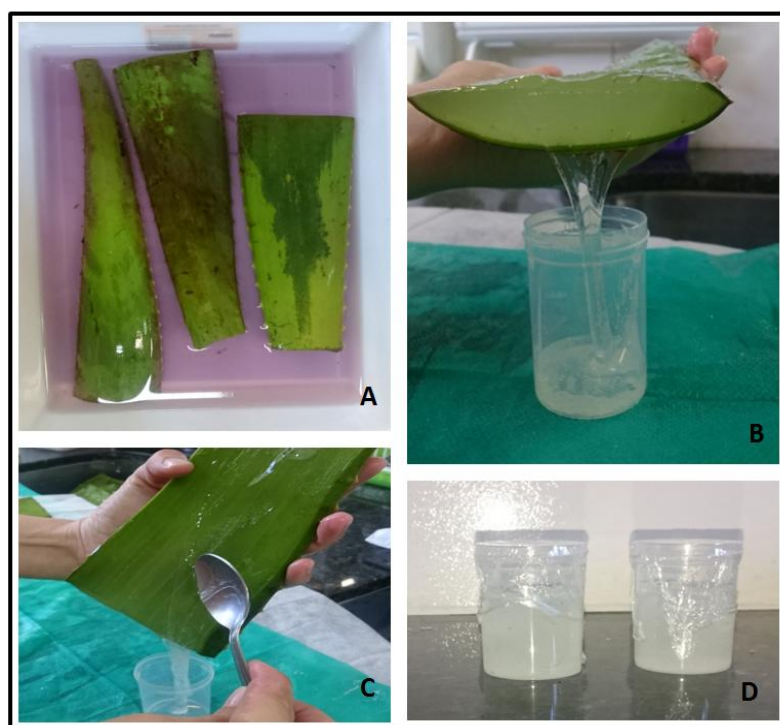


Figura 2. A. Folhas da *Aloe vera* após 24 h em água destilada. B e C. Raspagem do parênquima. D. Armazenamento do parênquima em coletor estéril enrolado em papel filme.

### 3.2.4 Parâmetros para irradiação a laser

Para aplicação do laser foi utilizado um aparelho Twin-laser (MMOptics<sup>®</sup>, Equipamentos Ltda., São Carlos, São Paulo, Brasil) com registro na agência nacional de vigilância sanitária (ANVISA) n. 80051420007 e certificado pelo Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial (INMETRO) sob o número NCC 2756/05, devidamente testado e calibrado

pelo fabricante antes de iniciar o experimento. Deve-se ressaltar que a utilização do laser seguiu as normas de segurança da ABNT, NBR/IEC601.2.22 e IEC 60825-1/2001. A irradiação nas placas foi realizada uma hora após os poços em contato com os eluatos. A aplicação foi dupla com intervalo de 6 h (Pereira *et al.*, 2002). Os parâmetros de irradiação estão descritos no Quadro 2.

Quadro 2. Parâmetros de irradiação para os grupos CL, AL, HL e HAL.

<b>Parâmetros de irradiação</b>	
Modo de emissão (CW)	Contínuo
Comprimento	660 nm
Meio ativo	InGaAlP
Potência óptica do laser (output)	10 mW
Potência óptica do laser (input)	40 mW
Área do ponto de feixe	4 mm
Área (cm <sup>2</sup> - $A=\pi.r^2$ )	0,04 cm <sup>2</sup>
Densidade de potência (PD)	0,25 W/cm <sup>2</sup>
Densidade de energia (ED)	3J/cm <sup>2</sup>
Tempo por ponto	12 segundos
Energia total	0,24J
Energia por sessão	0,12 J/poço
Divergência do feixe perpendicular à junção	17°
Ângulo da ponta	50°

A aplicação da densidade de energia foi de 3J/cm<sup>2</sup>, realizada selecionando-se a potência 40mW, mas neste valor o aparelho é calibrado para mostrar o tempo com intervalos de 10 segundos. Entretanto, selecionou-se 5J/cm<sup>2</sup> em 20 segundos, utilizando o aparelho até 12 segundos de aplicação por poço, resultando a aplicação final na dosagem requerida. Os experimentos foram desenhados de maneira padronizada, sendo desenvolvido um suporte de adaptação para a caneta do laser, como pode ser observado na Figura 3, logo que, a distância entre o feixe de luz e a superfície a ser irradiada foi constante.



Figura 3. Padronização para irradiação à laser.

### 3.2.5 Estudo da citotoxicidade

#### 3.2.5.1 Cultivo das células

O meio de cultivo foi renovado a cada dois dias com o objetivo de evitar a morte celular por falta de nutrientes. Deve-se ressaltar que as células foram cultivadas e mantidas em estufa de CO<sub>2</sub> durante período inicial do experimento. O monitoramento diário do crescimento das células foi realizado utilizando microscópio invertido de fase onde observou-se a morfologia e o comportamento dos fibroblastos (aderência e proliferação). Após a confirmação no microscópio de 80% de confluência (porcentagem de células que proliferaram na base do frasco de cultura) iniciou-se o subcultivo das células por meio de passagens consecutivas de frascos de cultura. Em cada passagem, as células aderidas foram desprendidas da garrafa de cultura por meio de digestão enzimática, utilizando 5mL de tripsina a 0,25% (Cultilab Ltda, Campinas, SP, Brasil), sendo todo o conjunto levado a incubadora a 37°C por 2 - 4 min (Silva *et al.*, 2012).

Em microscópio invertido de fase, observou-se o desprendimento das células para então a tripsina ser inativada com a adição de 5 mL de DMEM acrescido com 10% de SBF. As células em suspensão foram transferidas para tubos de ensaio e centrifugadas a 3000 rpm, numa temperatura de 25°C por 5 min. O sobrenadante foi aspirado e os precipitados de células (pellets) resultantes da centrifugação foram suspensos em 2mL de meio de cultura completo e depositados

em novo frasco de cultura de 50cm<sup>2</sup> com maior área para que as células pudessem se multiplicar. Dessa forma, foram realizadas no total três passagens até que atingisse o número de células suficientes para o plaqueamento.

### 3.2.5.2 Plaqueamento

As células foram tripsinizadas e contadas na câmara de Newbauer espelhada 0,0025mm<sup>2</sup> (Precicolor HGB, Germany) para a determinação do número de células existentes no frasco, a fim de proceder-se a diluição necessária para o plaqueamento em placas de cultura de 96 poços com fundo chato (Prolab, São Paulo-SP, Brasil). As diluições das células foram realizadas com DMEM completo de forma que, 200μL dessa suspensão celular preparada estivessem sementeadas em cada poço contendo  $2 \times 10^4$  células/poço. Em seguida, as placas de 96 poços foram acondicionadas em atmosfera úmida a 37°C com 5% CO<sub>2</sub> por 24h para que os fibroblastos pudessem aderir no fundo dos poços (Silva *et al.*, 2012). Nos grupos irradiados, o plaqueamento foi realizado de forma alternada. Utilizou-se uma placa para os grupos irradiados e outra placa para os não irradiados (Figura 4 e 5).

	CTR	AA	HA	HAA								
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	●	●	●	●	○	○	○	○	○	○	○	○
B	●	●	●	●	○	○	○	○	○	○	○	○
C	●	●	●	●	○	○	○	○	○	○	○	○
D	●	●	●	●	○	○	○	○	○	○	○	○
E	●	●	●	●	○	○	○	○	○	○	○	○
F	●	●	●	●	○	○	○	○	○	○	○	○
G	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
H	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○

Figura 4. Esquema do plaqueamento realizado para os grupos sem irradiação.

	CTR		CL		AL		HL		HAL			
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	●	○	●	○	●	○	●	○	●	○	○	○
B	●	○	○	●	○	●	○	●	○	●	○	○
C	●	○	●	○	●	○	●	○	●	○	○	○
D	●	○	○	●	○	●	○	●	○	●	○	○
E	●	○	●	○	●	○	●	○	●	○	○	○
F	●	○	○	●	○	●	○	●	○	●	○	○
G	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
H	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○

Figura 5. Esquema do plaqueamento realizado para os grupos com irradiação.

### 3.2.5.3 Preparo dos corpos de provas e dos eluatos

O teste de contato indireto utilizado nesta pesquisa para a sensibilização das células fibroblásticas realizou-se com eluatos das medicações intracanaís testadas, estes foram produzidos a partir da difusão dos componentes de cada medicação intracanal para o meio de cultura e colocados em contato com as células fibroblásticas (Sepet *et al.*, 2009; Silva *et al.*, 2012). Não foi realizada nenhuma diluição a partir dos eluatos originais com a finalidade de simular a rotina da prática clínica endodôntica, em que diluições não são realizadas.

Quanto ao medicamento endodôntico utilizado nessa pesquisa, este foi manipulado em placa de vidro estéril seguindo as recomendações do fabricante com o auxílio da espátula 24F (SSWhite duflex, Rio de Janeiro, RJ, Brasil), de acordo com a dosagem estabelecida no Quadro 1, até que fosse obtida a consistência de uma pasta. Em seguida, os corpos de prova foram confeccionados com forma e o volume padronizados para todos os grupos. Para isso, as pastas foram inseridas em tubos de polietileno estéreis com o diâmetro de 5mm por 2 mm de espessura (De Mendonça *et al.*, 2007; ISO, 2009).

As pastas do hidróxido de cálcio foram acondicionadas em uma atmosfera úmida a 37°C com 5% CO<sub>2</sub> durante 24h para que os corpos de provas iniciassem a presa e, facilitassem o processo de remoção dos tubos de polietileno. Após esse período, a medicação presente no interior dos tubos de polietileno foram submetidos ao processo de esterilização, por meio de

radiação ultravioleta, na câmara de fluxo laminar, por 1h para evitar qualquer tipo de contaminação (Modareszadeh *et al.*, 2011). Para a remoção da medicação do interior dos tubos de polietileno, foi realizada pressão no êmbolo existente no interior dos próprios tubos. Para cada corpo de prova nos *ependorfs* foi acrescido 1mL de meio de cultura DMEM suplementado com 10% de SBF e Penicilina/estreptomicina, todo o conjunto foi armazenado a 37°C por 24h, para que os produtos ativos da medicação intracanal pudessem se difundir pelo meio de cultura, produzindo destarte os eluatos (Camargo *et al.*, 2009; Bin *et al.*, 2012).

As pastas com *Aloe vera* foram manipuladas em Becker estéril, armazenadas em tubos Falcon protegido com papel alumínio e mantidos a temperatura ambiente por 24 h, pois, ocorre alteração da composição do gel a altas temperaturas e níveis de CO<sub>2</sub>. No mesmo tubo foi acrescido 5mL de meio de cultura DMEM suplementado com 10% de SBF e Penicilina/estreptomicina, todo o conjunto foi armazenado a temperatura ambiente 25°C por 24h, para que os produtos ativos da medicação intracanal pudessem se difundir pelo meio de cultura produzindo os eluatos.

#### **3.2.5.4 Contato das células com os eluatos**

Na placa de cultura de 96 poços o meio de cultura presente foi removido e, 100µL do eluato de cada medicação testada foi adicionado em cada poço. Dessa forma, cada 1mL preencheu 5 poços da placa de 96 poços onde estavam os fibroblastos, totalizando 40 poços por experimento (Yoshino *et al.*, 2013). Toda pesquisa foi realizada em triplicata de cada eluato em três experimentos independentes. Em seguida, as placas de cultura foram novamente encubadas em uma atmosfera úmida a 37°C, com 5% de CO<sub>2</sub>, pelos períodos experimentais de 24h, 48h, 72h (Sepet *et al.*, 2009).

#### **3.2.5.5 Irradiação a laser**

A aplicação do laser realizada em contato e por meio da base das placas de cultivo celular de 96 poços não permitiu o feixe laser atravessar o meio de cultura, sendo aplicado diretamente na monocamada celular. As placas são compostas por poliestireno transparente e têm menos de 1 mm de espessura. Devido a característica de espalhamento da radiação laser intercalou-se os poços para que não ocorresse sobrecarga de energia. A placa foi acomodada dentro de uma máscara escura feita de papelão preto fosco com perfurações de acordo com a localização dos

poços. As perfurações foram padronizadas com auxílio de perfurador de um furo (One hole Punch 97A0, Shanghai Genmes, China) com telas internas móveis, do mesmo material usado para confecção da máscara, de um furo somente, de acordo com a posição do poço, deixando somente a área a ser irradiada exposta (Pereira *et al.*, 2002; Damante CA, 2007). Ao termino das irradiações, as placas foram novamente incubadas a 37°C em atmosfera úmida com 5% de CO<sub>2</sub> e submetidas ao teste de citotoxicidade em 24h, 48h e 72h (Pereira *et al.*, 2002).

### **3.2.5.6 Análise da citotoxicidade**

A viabilidade das células, determinada por meio do método colorimétrico, utilizou o reagente MTT [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio brometo] (Life Technologies, Carlsbad, EUA) com a concentração de 5mg/mL em solução salina de tampão fosfato estéril em todos os períodos experimentais. Deve-se ressaltar que, o reagente é fotossensível, assim após a sua preparação, os tubos *eppendorfs* de 5mL contendo esta solução foram envolvidos em papel alumínio e a câmara de fluxo laminar permaneceu com a luz apagada durante todo o procedimento de colocação da solução nos poços.

Em cada período experimental, após a remoção dos eluatos dos poços, em cada poço foram dispensados 100µL da solução reagente de MTT. As placas de cultura foram envolvidas em papel alumínio e encubadas em atmosfera úmida a 37°C com 5% CO<sub>2</sub> por 1 hora para que o MTT possa ser metabolizado. Após esse período, a solução de MTT foi desprezada, facilitando a visualização da mudança de coloração no fundo de cada poço. Essa reação ocorre porque o sal metiltetrazólio da solução de MTT é reduzido pelas enzimas desidrogenases dos fibroblastos, formando cristais de formazan, que possuem coloração azul escuro. Esses cristais dissolveram-se na adição de DMSO (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA) e para cada poço foi utilizado 100µL e, as placas foram novamente armazenadas em atmosfera úmida a 37°C com 5% CO<sub>2</sub> por 10 min.

A coloração da solução variou do roxo claro até o roxo escuro, de acordo com a quantidade de cristais de formazan presentes em cada poço e, conseqüentemente, de células viáveis. Quanto mais intensa a cor da solução, menos citotóxica a substância se apresenta. Por fim, a leitura das placas de cultura realizada no espectrofotômetro (Cambrex ELx808cse) (Figura 6) no comprimento de onda de 570 nm (Bin *et al.*, 2012; Hirschman *et al.*, 2012) obteve dados



pelo programa Gen5 Data Analysis Software (BioTek U.S. - World Headquarters, EUA), com protocolo de agitação por 10 segundos seguidos pela leitura.



Figura 6. Espectrofotômetro.

### **3.2.6 Estudo da genotoxicidade**

#### **3.2.6.1 Cultivo celular e plaqueamento**

Os fibroblastos pulpaes humanos FP6 foram cultivados em DMEM (LGC Biotecnologia, Cotia, Brasil) suplementado com 10% de SBF (Invitrogen, Nova York, EUA) a 37°C e 5% CO<sub>2</sub>. Então, 3 x 10<sup>5</sup> células foram cultivadas com 4 mL de meio celular por 24 h a 37°C em atmosfera de 5% CO<sub>2</sub> em placas de 24 poços com fundo chato (Prolab, São Paulo-SP, Brasil).

























	CTR	AA	HA	HAA		
	1	2	3	4	5	6
A						
B						
C						
D						

Figura 7. Esquema do plaqueamento realizado para os grupos sem irradiação.

























	CTR	CL	AL	HL	HAL	
	1	2	3	4	5	6
A						
B						
C						
D						

Figura 8. Esquema do plaqueamento realizado para os grupos com irradiação.

### 3.2.6.2 Preparo dos corpos de provas e dos eluatos

O preparo dos corpos de provas e dos eluatos foram realizados conforme descrito no teste de citotoxicidade.

### 3.2.6.3 Contato das células com os eluatos

As células foram expostas aos eluatos por 24 horas, conforme os grupos experimentais. Para tanto,  $2 \times 10^4$  células/mL de DMEM foram cultivadas em placas de 24 poços. Após incubação de 24 horas, o sobrenadante foi descartado e realizadas lavagens com solução salina tamponada (livre de cálcio e magnésio PBS-CMF) para descarte de células não viáveis. Posteriormente, as células foram fixadas com formaldeído 10% por 10 min. Após nova lavagem, foram adicionados 200  $\mu$ L de PBS e uma gota de *fluoroshield with* DAPI. A placa foi levada para agitação em mesa orbital (Solab. Piracicaba, São Paulo) por 5 min sob proteção da luz.

#### **3.2.6.4 Irradiação a laser**

A aplicação do laser utilizou a mesma metodologia e protocolo realizado no teste de citotoxicidade.

#### **3.2.6.5 Análise da genotoxicidade**

Os micronúcleos foram analisados em microscópio de fluorescência (100X), sendo provável avaliação de 1.000 células/placa por concentração em pelo menos dois experimentos independentes. Os micronúcleos são identificados como estruturas de DNA contidas no citoplasma claramente separadas do núcleo principal, cercados por uma membrana nuclear, e incluindo uma área menos que 1/3 da área do núcleo principal, ambos corados em azul.

### **3.3 Análise estatística**

A avaliação da citotoxicidade foi realizada somando os valores absolutos da densidade óptica obtidos na leitura do espectrofotômetro e calculando a média de cada medicação intracanal testada em cada tempo experimental. Na análise da genotoxicidade através da densidade óptica somente foram contadas as células mononucleadas contendo micronúcleos, células em mitose e as que exibiram fragmentação nuclear por apoptose. Os dados obtidos em ambos os testes foram analisados estatisticamente pelo teste ANOVA, complementado pelo teste Tukey, com significância de 5% ( $p \leq 0.05$ ), através do programa estatístico GraphPad Prism 5.0.

#### 4. RESULTADOS

##### **Cytotoxicity and genotoxicity analysis of *Aloe vera* associated product endodontic and photobiomodulation laser**

##### **Análise da citotoxicidade e genocitotoxicidade da *Aloe vera* associada a medicamento endodôntico e fotobiomodulação a laser**

Periódico para submissão: Journal of endodontics

Fator de impacto: 2.788.

Qualis (Odontologia): A1

Carvalho, Nayane Chagas<sup>1</sup>; Albuquerque-Júnior<sup>2</sup>, Ricardo Luiz Cavalcanti; Araújo<sup>3</sup>, Adriano Antunes de Souza; Paranhos<sup>3</sup>, Luiz Renato; Camargo<sup>4</sup>, Samira Esteves Afonso; Ribeiro<sup>3</sup>, Maria Amália Gonzaga.

1- Pós-graduando do Programa de Pós-Graduação em Odontologia da Universidade Federal de Sergipe, Sergipe, Brasil.

2- Professor da Universidade Tiradentes, Sergipe, Brasil.

3- Professor da Universidade Federal de Sergipe, Sergipe, Brasil.

4- Professor da Universidade Estadual Paulista - UNESP, São José dos Campos, São Paulo, Brasil.

Correspondência do autor: Maria Amália Gonzaga Ribeiro. Universidade Federal de Sergipe, Hospital Universitário. Rua Cláudio Batista, s/n. Bairro: Sanatório. Aracaju, Sergipe, Brasil. CEP: 49060-100. Email: endoribeiro@yahoo.com.br.

## RESUMO

Este estudo objetiva avaliar *in vitro* o efeito da *Aloe vera* associada a medicamento de uso endodôntico combinados ou não a FTL em fibroblastos pulpaes humanos FP6. Os grupos foram divididos em: CTR com meio de cultura com fibroblastos; CL, apenas FTL; AA, *Aloe vera* com água destilada; AL, *Aloe vera* com água destilada e FTL; HA, hidróxido de cálcio P.A. com água destilada; HL, hidróxido de cálcio P.A. com água destilada e FTL; HAA, hidróxido de cálcio P.A. com *Aloe vera* e água destilada; HAL, hidróxido de cálcio P.A. com *Aloe vera*, água destilada e FTL. A avaliação da citotoxicidade sucedeu-se com o reagente MTT em 24, 48 e 72 h e, para avaliação da genotoxicidade utilizou-se o teste de micronúcleo em 24 h. Em 24 h, o grupo CL apresentou a maior média de viabilidade celular, e o HA mostrou menor média mas estimulou maior número de divisão celular. Em 48 h, o grupo CL apresentou a maior média de viabilidade celular apesar da elevada genotoxicidade, e o HAL mostrou menor média. O grupo AL demonstrou maior percentual de células sobreviventes em 72 h com diferença estatística dos grupos HA e HL ( $p < 0,05$ ). O grupo AL exibiu alta genotoxicidade tendo resultados significantes quando em comparação com o grupo CTR ( $p < 0,001$ ) e ao grupo AA ( $p < 0,01$ ). Conclui-se que a *Aloe vera* permitiu uma maior viabilidade celular em fibroblastos pulpaes humanos na presença do hidróxido de cálcio, contudo houve aumento da genotoxicidade nessa associação. Já o hidróxido de cálcio e a FTL apresentaram maior citotoxicidade.

Palavras-chave: *Aloe vera*; Citotoxicidade; Fotobiomodulação a laser; Genotoxicidade; Medicamentos endodônticos.

## INTRODUÇÃO

Um dos objetivos da Endodontia é devolver ao elemento dental suas funções estéticas e funcionais ao sistema estomatognático. Para atingir essa meta, o profissional necessita conhecer a complexidade do sistema de canais radiculares (SCR) de dentes com periodontite apical e radiolusência periapical, conciliar a escolha da técnica mais apropriada para esses casos, associar substâncias e medicamentos que promovam a desinfecção dos túbulos dentinários a fim

de obter a sanificação desejada e propiciar o processo de reparo dos tecidos que compõem o periápice (1,2).

Um fator que dificulta alcançar estes propósitos refere-se à presença de microrganismos, principalmente quando presentes em regiões de difícil acesso aos instrumentos, tais como, istmos, ramificações, canais laterais, acessórios e deltas apicais, e, na intimidade dos canalículos dentinários, necessitando, destarte, de medicamentos entre sessões que alcancem essas regiões (3,4).

Dentre as medicações mais utilizadas na prática endodôntica destacam-se o hidróxido de cálcio, antissépticos e os antibióticos (5,6). Estes medicamentos promovem a eliminação de bactérias que sobreviveram ao preparo biomecânico, reduzem a inflamação perirradicular, neutralizam produtos tóxicos e estimulam a reparação por tecido mineralizado (7).

Conceitua citotoxicidade o efeito destrutivo de um material às células (8), e genotoxicidade a detecção de danos ao material genético tais como quebra de DNA, mutação genética, quebra cromossômica e alteração na capacidade de reparo do DNA (9). Para justificar a aplicabilidade da medicação intracanal, essa deve apresentar alta atividade antimicrobiana, baixa citotoxicidade e genotoxicidade, objetivando atingir um potencial para eliminar as bactérias sem danificar os tecidos periapicais (10,11).

Outro recurso utilizado como coadjuvante na prática odontológica refere-se à fotobiomodulação a laser, o qual possui ação analgésica, anti-inflamatória, antiedematosa, auxiliando o processo de reparo tecidual (12). Dentre os mecanismos que envolvem a atuação da terapia a laser, destacam-se, aumento da microcirculação local, angiogênese, vasodilatação e inibição de mediadores inflamatórios como prostaglandinas (13,14). A ação do laser evita o início da cascata do ácido araquidônico em tecidos lesados, levando à diminuição da produção de prostaglandinas (15).

Novos produtos naturais com capacidade de reparação têm sido estudados a fim de auxiliar e agilizar o tratamento endodôntico em casos de dentes com periodontite apical e radiolusência periapical. Dentre eles, cita-se a planta *Aloe vera*, que possui propriedades medicinais comprovadas, empregada amplamente na medicina, em indústrias farmacêuticas, alimentícias, cosméticas (16) possui baixo custo e é comerciável em todo o Brasil (17). Esta detém propriedades que interessam a área endodôntica (16), popularmente conhecida como “babosa”, apresenta propriedades anti-inflamatória, antibacteriana e induz a reparação tecidual

(18). Sendo assim, este estudo objetiva analisar a citotoxicidade e genotoxicidade da *Aloe vera* associada a medicamento de uso endodôntico combinados ou não a fotobiomodulação a laser em fibroblastos pulpare humanos (FP6) em 24, 48 e 72 h.

## METODOLOGIA

Toda a metodologia da pesquisa foi realizada de acordo com as normas da International Organization of Standardization (ISO) 10993-5:2009. A linhagem de fibroblastos pulpare humanos (FP6) utilizada na pesquisa foi obtida no banco de células do Laboratório de Biologia Celular da UNESP - Universidade Estadual Paulista, Campus de São José dos Campos.

### - Divisão dos grupos experimentais conforme descrito Quadro 1:

Quadro1. Descrição dos grupos e das proporções das medicações intracanaís analisadas na pesquisa.

Grupos	Substâncias	Dosagem
<b>CTR</b> (Controle)	Meio de cultura com fibroblastos	200µL/poço
<b>CL</b>	FTL*	-
<b>AA</b>	<i>Aloe vera</i> Água destilada	200mg 5mL
<b>AL</b>	<i>Aloe vera</i> Água destilada FTL*	200mg 5mL
<b>HA</b>	Hidróxido de cálcio P.A. Água destilada	1g 1.1mL
<b>HL</b>	Hidróxido de cálcio P.A. Água destilada FTL*	1g 1.1mL
<b>HAA</b>	Hidróxido de cálcio P.A. Água destilada <i>Aloe vera</i>	1g 6.1mL 200mg
<b>HAL</b>	Hidróxido de cálcio P.A. Água destilada <i>Aloe vera</i> FTL*	1g 6.1mL 200mg

\*- fotobiomodulação a laser.

### - Preparação dos extratos

As folhas da *Aloe vera* foram adquiridas no estado de Sergipe identificadas com voucher de número ASE-37.261. O gel foi obtido por meio de raspagem do parênquima, filtrado, armazenado em coletor estéril enrolado em papel filme, levado ao freezer onde permaneceu até o congelamento em torno de  $-18^{\circ}$  a  $-25^{\circ}$ . A amostra obtida passou pelo processo de liofilização em que sucede retirada toda a água do gel mucilaginoso no estado sólido diretamente para o estado gasoso restando somente a parte sólida e, ocorre também a eliminação de qualquer tipo de micro-organismo. As pastas com *Aloe vera* foram manipuladas em Becker estéril, armazenadas em tubos Falcon protegido com papel alumínio e mantidos a temperatura ambiente por 24 h. No mesmo tubo foi acrescido 5mL de meio de cultura DMEM suplementado com 10% de SBF e Penicilina/ estreptomicina, todo o conjunto foi armazenado em estufa de 5% de  $\text{CO}_2$  a  $37^{\circ}\text{C}$  por 24h.

Os corpos de prova foram confeccionados com forma e o volume padronizados para todos os grupos. Para isso, as pastas foram inseridas em tubos de polietileno estéreis com o diâmetro de 5mm por 2 mm de espessura (19, 20). As pastas do hidróxido de cálcio foram acondicionadas em uma atmosfera úmida a  $37^{\circ}\text{C}$  com 5%  $\text{CO}_2$  durante 24h para que os corpos de provas iniciassem a presa. Após esse período, ainda dentro dos tubos de polietileno esterilizamos a medicação por meio de radiação ultravioleta, na câmara de fluxo laminar, por 1h para evitar qualquer tipo de contaminação (21). Nos eppendorfs foi acrescido 1mL de meio de cultura DMEM suplementado com 10% de SBF e Penicilina/estreptomicina, todo o conjunto foi armazenado a  $37^{\circ}\text{C}$  e 5% de  $\text{CO}_2$  por 24h, para que os produtos ativos da medicação intracanal possam se difundir pelo meio de cultura produzindo os eluatos (11,22).

#### **- Parâmetros para Irradiação a laser**

Para aplicação do laser foi utilizado um aparelho Twin-laser (MMOptics<sup>®</sup>, Equipamentos Ltda., São Carlos, São Paulo, Brasil) com registro na agência nacional de vigilância sanitária (ANVISA) n. 80051420007 e certificado pelo Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial (INMETRO) sob o número NCC 2756/05. Uma hora após os poços em contato com os eluatos realizou-se a irradiação nas placas e outra com intervalo de 6 h (23). Os parâmetros de irradiação estão descritos no Quadro 2.



Quadro 2. Parâmetros de irradiação para os grupos CL, AL, HL e HAL.

Parâmetros de irradiação	
Modo de emissão (CW)	Contínuo
Comprimento	660 nm
Meio ativo	InGaAlP
Potência óptica do laser (output)	10 mW
Potência óptica do laser (input)	40 mW
Área do ponto de feixe	4 mm
Área (cm <sup>2</sup> - $A=\pi.r^2$ )	0,04 cm <sup>2</sup>
Densidade de potência (PD)	0,25 W/cm <sup>2</sup>
Densidade de energia (ED)	3J/cm <sup>2</sup>
Tempo por ponto	12 segundos
Energia total	0,24J
Energia por sessão	0,12 J/poço
Divergência do feixe perpendicular à junção	17°
Ângulo da ponta	50°

A aplicação desejada por poço foi de 3J/cm<sup>2</sup>. Os experimentos foram desenhados de maneira padronizada, sendo desenvolvido um suporte com o laser adaptado a este para posicionar as placas a serem irradiadas. Sabendo que a distância entre o laser e a superfície de aplicação é crítica a distância entre o feixe laser e as células foi constante. Devido a característica de espalhamento da radiação laser intercalou-se os poços para que não ocorresse sobrecarga de energia. A placa foi acomodada dentro de uma máscara escura feita de papelão preto fosco com perfurações de acordo com a localização dos poços, deixando somente a área a ser irradiada exposta (23,24). Ao termino das irradiações, as placas foram novamente incubadas a 37°C em atmosfera úmida com 5% de CO<sub>2</sub> (23).

#### - Teste da citotoxicidade

Os fibroblastos pulpare humanos (FP6) foram cultivados em DMEM (LGC Biotecnologia, Cotia, Brasil) suplementado com 10% de SBF (Invitrogen, Nova York, EUA) a

37°C e 5% CO<sub>2</sub>. Então, 3 x 10<sup>5</sup> células foram cultivadas com 4 mL de meio celular por 24 h a 37°C em atmosfera de 5% CO<sub>2</sub> em placas de 96 poços com fundo chato (Prolab, São Paulo-SP, Brasil). Nos poços das placas onde os fibroblastos ficaram aderidos, foi removido o meio de cultura presente e, 100µL do eluato de cada medicação testada foi adicionado em cada poço. Toda pesquisa foi realizada em triplicata de cada eluato em três experimentos independentes (25). Em cada período experimental, após a remoção dos eluatos dos poços, em cada poço foram dispensados 100µL da solução reagente de MTT [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il) -2,5-difeniltetrazolio brometo] (Life Technologies, Carlsbad, EUA). As placas de cultura foram envolvidas em papel alumínio e encubadas em atmosfera úmida a 37°C com 5% CO<sub>2</sub> por 1 hora para que o MTT possa ser metabolizado. Após esse período, a solução de MTT foi desprezada, facilitando a visualização da mudança de coloração do roxo claro até o roxo escuro no fundo em cada poço. Essa reação ocorre porque o sal metiltetrazólio da solução de MTT é reduzido pelas enzimas desidrogenases dos fibroblastos, formando cristais de formazan, que possuem coloração azul escuro. Esses cristais dissolveram-se na adição de DMSO (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA) sendo que em cada poço foi colocado 100 µL e, as placas foram novamente armazenadas em atmosfera úmida a 37°C com 5% CO<sub>2</sub> por 10 min. Por fim, a leitura das placas de cultura realizada no espectrofotômetro (Cambrex ELx808cse) no comprimento de onda de 570 nm (9,22) obtendo dados pelo programa Gen5 Data Analysis Software (BioTek U.S. - World Headquarters, EUA), com protocolo de agitação por 10 seg seguidos pela leitura.

#### **- Teste da genotoxicidade**

A identificação da genotoxicidade foi realizada através do teste de micronúcleo (*fluoroshield with DAPI*). No qual, 3 x 10<sup>5</sup> fibroblastos pulpaes humanos (FP6) foram cultivados com 4 mL de DMEM suplementado com 10% de SBF por 24 h a 37°C em atmosfera de 5% CO<sub>2</sub> em placas de 24 poços com fundo chato (Prolab, São Paulo-SP, Brasil). As células foram expostas aos eluatos por 24 h, conforme os grupos experimentais. Logo após, o sobrenadante foi descartado e foram feitas lavagens com solução salina tamponada (livre de cálcio e magnésio PBS-CMF) para descarte de células não viáveis. Posteriormente, as células foram fixadas com formaldeído 10% por 10 min. Após nova lavagem, foram adicionados 200 µL de PBS e uma gota de *fluoroshield with DAPI*. A placa foi levada para agitação em mesa orbital (Solab. Piracicaba, São Paulo) por 5 min sob proteção da luz. Os micronúcleos foram analisados em microscópio de

fluorescência (100X), sendo provável avaliação de 1.000 células/placa por concentração em pelo menos três experimentos independentes. Os micronúcleos são identificados como estruturas de DNA contidas no citoplasma claramente separadas do núcleo principal, cercados por uma membrana nuclear, e incluindo uma área menos que 1/3 da área do núcleo principal, ambos corados em azul.

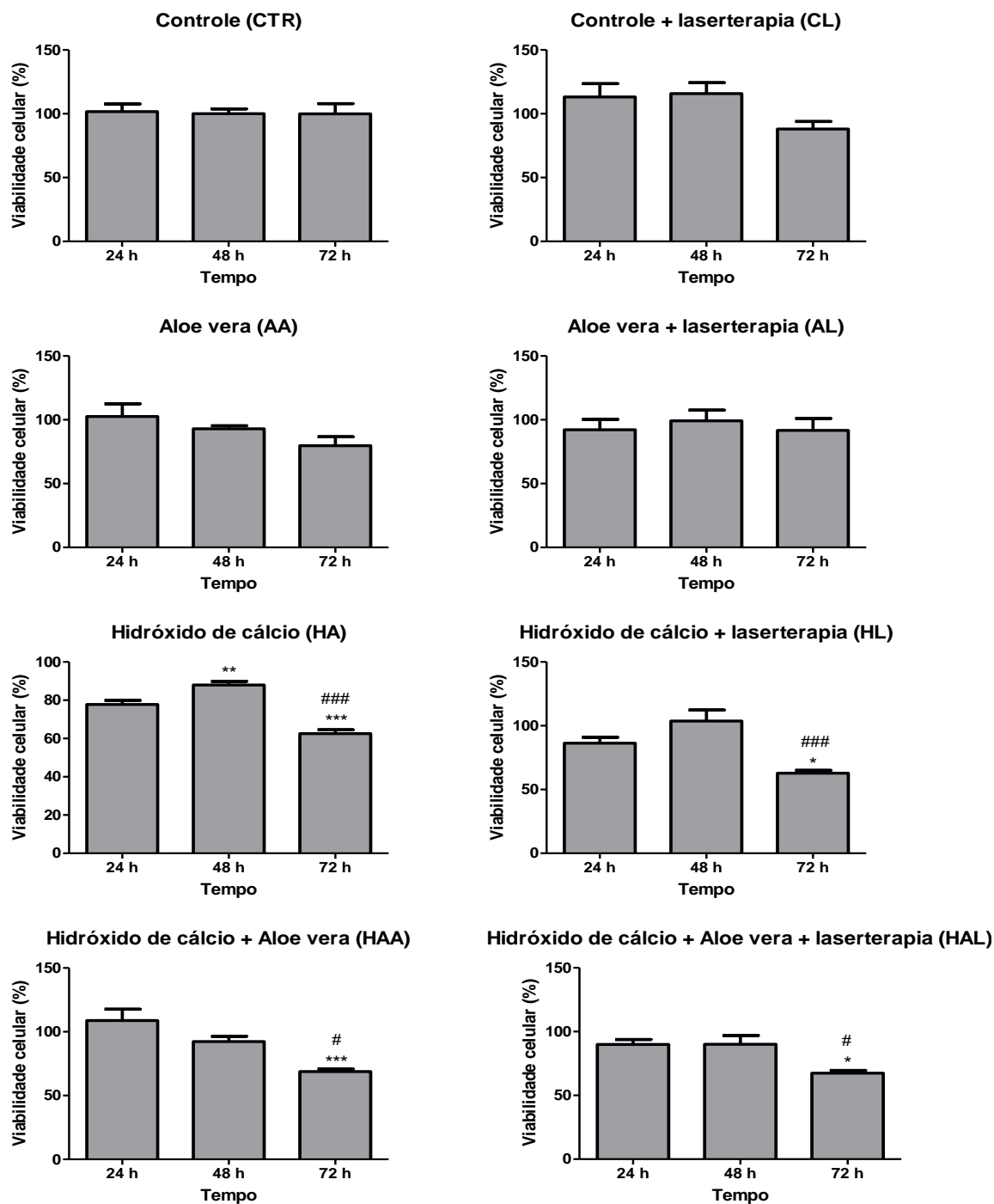
#### **- Análise estatística**

A avaliação da citotoxicidade foi realizada somando os valores absolutos da densidade óptica obtidos na leitura do espectrofotômetro e calculando a média de cada medicação intracanal testada em cada tempo experimental. Na análise da genotoxicidade através da densidade óptica somente foram contadas as células mononucleadas contendo micronúcleos, células em mitose e as que exibiram fragmentação nuclear por apoptose. Os dados obtidos em ambos os testes foram analisados estatisticamente pelo teste ANOVA, complementado pelo teste Tukey, com significância de 5% ( $p \leq 0.05$ ), através do programa estatístico GraphPad Prism 5.0.

### **RESULTADOS**

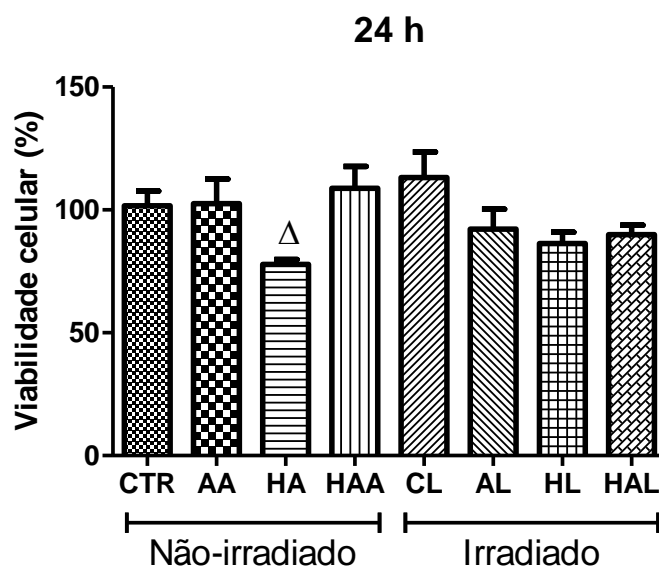
O hidróxido de cálcio (HA) em 48h provocou aumento da viabilidade celular quando comparado ao de 24h ( $p < 0,01$ ), ao passo que, em 72h exibiu diminuição considerável, comparado ao de 24h e 48h ( $p < 0,001$ ) (Gráfico 1).

O grupo HAA em 72h obteve diminuição da contagem celular quando relacionado ao de 48h ( $p < 0,05$ ) e redução significativa em relação ao de 24h ( $p < 0,001$ ). A FTL nos grupos HL e HAL em 72h apresentaram diferença considerável em 48h ( $p < 0,001$ ) e diferença significativa de 48h ( $p < 0,05$ ), respectivamente, e ambos diminuíram a viabilidade celular quando alinhado com 24h ( $p < 0,05$ ) (Gráfico 1).



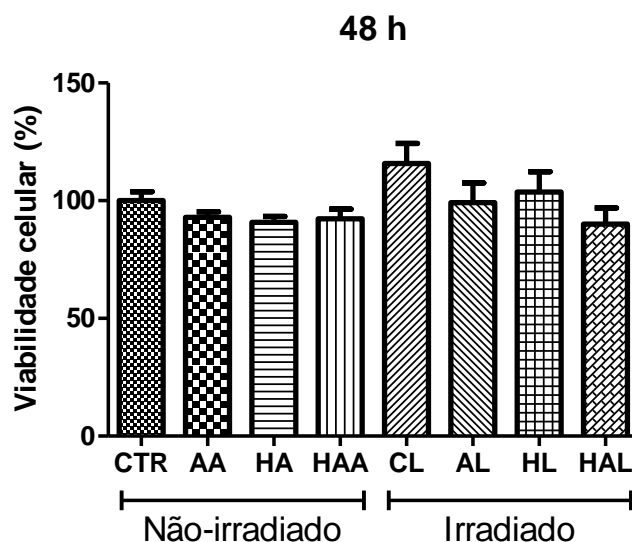
**Gráfico 1.** Determinação do percentual médio de viabilidade celular de cada grupo em relação à média do grupo controle ao longo do período experimental. Dados expressos como média  $\pm$  erro padrão da média. \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$  e \*\*\*  $p < 0,001$ , significativamente diferentes de 24h; #  $p < 0,05$ , ##  $p < 0,01$  e ###  $p < 0,001$  significativamente diferente de 48h (ANOVA e pós-teste de Tukey).

O maior percentual de células sobreviventes em 24h foi a do grupo tratado apenas com laser (CL), apresentando em média 113,13%, sem diferença significativa dos demais grupos tratados. O grupo hidróxido de cálcio (HA) em 24h apresentou a menor taxa de sobrevivência celular, 77,81%, diferindo significativamente apenas do grupo CL ( $p<0,05$ ) (Gráfico 2).



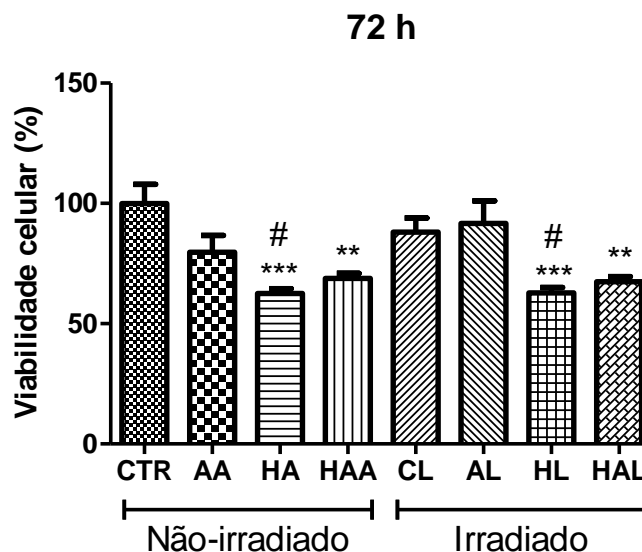
**Gráfico 2.** Determinação do percentual médio de viabilidade celular em relação à média do grupo controle após 24h. Dados expressos como média  $\pm$  erro padrão da média.  $\Delta$   $p<0,05$ , significativamente diferente de CL (ANOVA e pós-teste de Tukey).

O grupo com apenas laser (CL) demonstrou maior percentual de células sobreviventes em 48h e em todo o experimento, com média de 115,85% de viabilidade celular, não apresentando diferença estatística dos demais grupos tratados, bem como do grupo controle (100% viável). E o grupo em 48h que exibiu a menor taxa de sobrevivência celular foi o HAL com 90,07% (Gráfico 3).



**Gráfico 3.** Determinação do percentual médio de viabilidade celular em relação à média do grupo controle após 48h. Dados expressos como média  $\pm$  erro padrão da média. Não houve diferença significativa entre os grupos ( $p > 0,05$ , ANOVA).

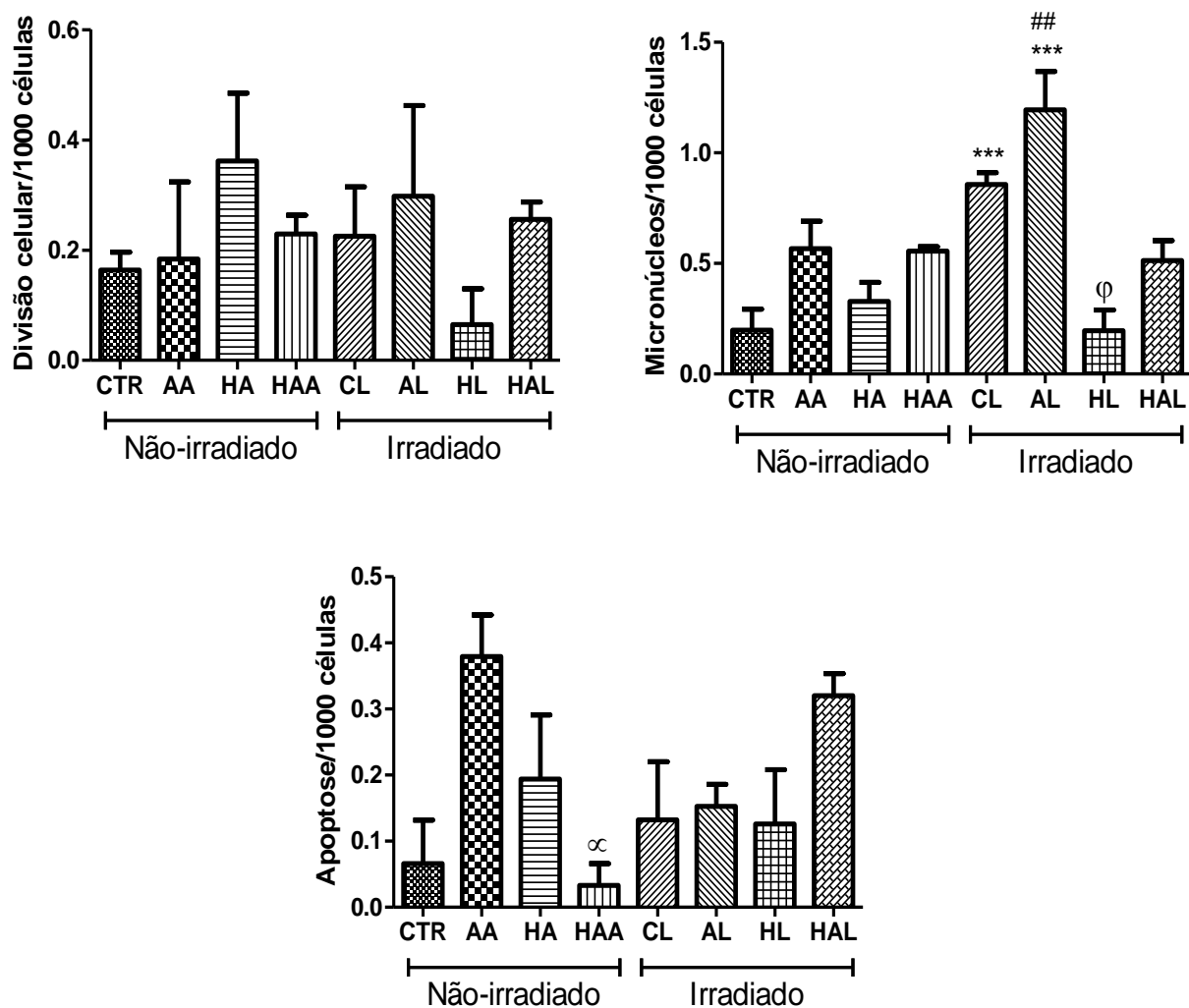
O grupo tratado com *Aloe vera* e FTL (AL) demonstrou maior percentual de células sobreviventes em 72h, exibindo como média, 91,71%, com diferença estatística dos grupos HA e HL ( $p < 0,05$ ). A menor taxa de sobrevivência celular, inclusive em todo o experimento, foi obtida no grupo HL em 72h, com 62,56% de média, apresentando diferença significativa do grupo controle (CTR) ( $p < 0,001$ ). Nos grupos HA e HL, ambos em 72h, constatou-se diferença estatística significativa ( $p < 0,001$ ) com o CTR. (Gráfico 4).



**Gráfico 4.** Determinação do percentual médio de viabilidade celular em relação à média do grupo controle após 72h. Dados expressos como média  $\pm$  erro padrão da média. \*\*\*  $p<0,001$  e \*\*  $p<0,01$ , significativamente diferentes de CTR; #  $p<0,05$ , significativamente diferente de AL (ANOVA e pós-teste de Tukey).

O hidróxido de cálcio puro (HA), foi o grupo que estimulou maior divisão celular, seguindo da *Aloe vera* com FTL (AL). Já o grupo com hidróxido de cálcio e FTL (HL) não promoveu igual proliferação celular destacando-se por expor menor efeito (Gráfico 5).

Com relação os teste de micronúcleos, verificou-se que o grupo AL apresentou maior genotoxicidade tendo resultados significantes quando em comparação com o grupo CTR ( $p<0,001$ ) e ao grupo AA ( $p<0,01$ ). Da mesma maneira o grupo CL exibiu alta genotoxicidade, sucessivamente os grupos AA e HAL. Em parte, o grupo HL indicou baixa genotoxicidade ( $p<0,001$ ) (Gráfico 5).



**Gráfico 5.** Determinação do número médio de alterações consistentes com genotoxicidade nos diferentes grupos após 24h. Dados expressos como média  $\pm$  erro padrão da média. \*\*\*  $p < 0,001$ , significativamente diferentes de CTR; ##  $p < 0,01$ , significativamente diferente de AA; φ  $p < 0,001$  significativamente diferentes de CL e AL; ∞  $p < 0,05$  significativamente diferente de AA (ANOVA e pós-teste de Tukey).

A indução apoptótica foi elevada nos grupos AA e HAL. Contudo, os demais grupos apresentaram uma média um pouco maior que o CTR excetuando-se o grupo HAA, que mostrou menor número de células apoptóticas com resultados significativamente diferente de AA ( $p < 0,05$ ) (Gráfico 5).



## DISCUSSÃO

Esta pesquisa evidenciou que o uso da FTL ocasionou uma diminuição da viabilidade celular na associação da *Aloe vera* com medicamento endodôntico padrão. No entanto, a FTL estimulou maior proliferação celular quando foi utilizada unicamente e associada a apenas uma medicação intracanal. A atuação do laser não influenciou na genotoxicidade da associação da *Aloe vera* com o hidróxido de cálcio. Ambos os grupos HAA e HAL apresentaram média de Micronúcleos/1000 células de 0,55 e 0,51 respectivamente, demonstrando que a FTL não interfere na genotoxicidade dos medicamentos combinados. Porém, foi constatado que a presença da *Aloe vera* aumentou a mutação gênica quando comparada ao hidróxido de cálcio isolado, obtendo um índice menor de biocompatibilidade.

A designação pelos fibroblastos foi devido ao fácil e rápido crescimento, localizados em áreas susceptíveis aos efeitos de medicamentos intracanaís e seus produtos de degradação, a saber, tecidos periapicais e ligamentos periodontais. Estas células são os principais produtores de tecido colágeno e, portanto, participam ativamente no processo de reparação tecidual (26,27,28,29).

O hidróxido de cálcio é o material padrão-ouro para o tratamento de canais radiculares (30), cujas propriedades são: atividade antimicrobiana (31), bloqueio mecânico para evitar a reinfecção do canal (32), limitação da reabsorção radicular (33), indução à formação de tecido mineralizado e promoção de reparo dos tecidos periapicais e adjacentes (34) com ação anti-inflamatória secundária. Essa medicação intracanal não apresentou genotoxicidade, porém demonstrou citotoxicidade observada também em outros estudos (35,36,37). Entretanto, alguns autores discordaram desses achados (28,38,39). Essa inconsonância pode estar relacionada à diversidade de etapas dos protocolos existentes entre as pesquisas, como a taxa entre a área de superfície dos corpos de prova e o volume do meio de cultura estipulado pela ISO 10993-5:2009 (19) que varia entre 0,5-6,0cm<sup>2</sup>/mL.

A ação do hidróxido de cálcio diretamente na célula promove alterações físico-químicas, clivagem de glicoproteínas, desnaturação de proteínas e formação de áreas de necrose com rápida precipitação de cristais, causando deposição de íons cálcio e fósforo, bem como formação de calcificação distrófica (40). Conforme Ribeiro *et al.*, 2013 (41), a ação do hidróxido de cálcio quando em contato direto com o tecido subcutâneo de ratos promove focos de necrose de coagulação e calcificação distrófica.

No tocante a *Aloe vera*, esta estimula a cicatrização através da produção de anticorpos e promove varredura dos radicais livres produzidos pelos neutrófilos. As propriedades anti-inflamatórias desta planta, diferente dos esteroides, ao mesmo tempo em que bloqueiam a inflamação estimulam o crescimento dos fibroblastos e aceleram o processo de cicatrização (42). Ressalta-se que a região de plantio e a forma de cultivo da planta podem mudar sua composição química (43). A acemanana é o principal polissacarídeo extraído a partir de gel *Aloe vera*, o qual também é capaz de promover a proliferação celular da polpa dentária, a diferenciação e a mineralização da matriz extracelular (44,45).

No presente estudo, a *Aloe vera* exibiu baixa citotoxicidade provavelmente devido à presença da enzima catalase, a qual converte peróxido de hidrogênio antioxidante ( $H_2O_2$ ) em água e oxigênio, suprimindo a geração destes radicais livres melhorando eficácia celular, conservação e impedindo a peroxidação lipídica. Assim, a presença de antioxidantes da *Aloe vera* é necessária para inibir a geração de radicais livres, minimizando assim os danos celulares (46). No entanto, esta planta promoveu aumento na frequência de alterações genéticas nos fibroblastos expressando danos no cromossomo através das formações de micronúcleos (47). Estes são considerados importantes biomarcadores de genotoxicidade, uma vez que são fragmentos de material genético separados do núcleo, formados durante a telófase da mitose ou meiose em consequência de danos cromossomais sofridos pela exposição a agentes externos (48).

Em outro experimento *in vitro*, a acemanana, nas concentrações de 2 até 16mg/mL, aumentou de maneira significativa a proliferação de fibroblastos gengivais e estimulou a secreção do fator de crescimento de queratinócitos – 1 (KGF-1) e do fator de crescimento vascular endotelial (VEGF), além de colágeno do tipo I. Todas essas substâncias estão diretamente ligadas com a cicatrização, uma vez que desempenham papéis importantes, como reepitelização tecidual, formação de vasos sanguíneos e formação de tecido conjuntivo (45).

Conforme estudos pioneiros no uso da FTL, como por exemplo, Loevschall *et al.*, 1994 (49), a densidade de energia utilizada nesta pesquisa apresenta efeitos estimulantes na síntese de ácido desoxirribonucleico (ADN) aumentando a proliferação dos fibroblastos (50). Além disso, segundo orientação da ISO 10993-5:2009 (19), o parâmetro de irradiação a laser utilizado está relacionado ao comprimento de onda visível, a qual é absorvida pelos fotorreceptores das mitocôndrias, resultando em efeitos fotoquímicos que desencadeiam uma cascata de eventos metabólicos, obtendo como resposta final a biomodulação (51).

Na interação com a FTL, observou-se uma tendência ao aumento da viabilidade celular com o passar dos períodos experimentais em 24 e 48h nos grupos CL( $p>0,05$ ) e HL( $p<0,001$ ), provavelmente por aumentar a concentração de ATP, estimulando a proliferação de fibroblastos e consequentemente a liberação de fatores de crescimento celular (PDGF, IGF-I, TGF) (52,53). Porém, observou-se um decréscimo em 72h, o que demonstra aumento da citotoxicidade dos medicamentos ao decorrer do tempo, já que o laser foi aplicado nas primeiras horas do experimento. Entretanto, o grupo HL apresentou o menor índice de genotoxicidade ( $p<0,001$ ) e, ao passo que o CL apresentou alto índice com  $p<0,001$ .

O grupo somente com *Aloe vera* (AA) ocasionou morte celular em 72h (79,71%) e, quando associada à FTL (AL) causou aumento da viabilidade celular (91,77%) divergindo dos demais achados na pesquisa e da literatura (52,53). A *Aloe vera* (AA) apresentou alta genotoxicidade, e quando associada a FTL (AL) aumentou ainda mais essas alterações gênicas com resultado significativo ( $p<0,001$ ). No grupo HAA, o hidróxido de cálcio aumentou a citotoxicidade principalmente em 72h ( $p<0,001$ ) supostamente pela pouca solubilidade do medicamento e aumento do pH, o qual promove desnaturação enzimática e destruição da membrana celular, levando à morte celular (25,26,33), mas não demonstrou genotoxicidade.

As associações da *Aloe vera* com a FTL visam facilitar o uso de hidróxido de cálcio, melhorar a capacidade antimicrobiana, possibilitar a difusão de íons através dos túbulos dentinários, ajudar na radiopacidade, biocompatibilidade e textura do material (54). Neste contexto, as qualidades benéficas desta planta quando associada ao hidróxido de cálcio podem aumentar a reparação apical e periapical. Este estudo demonstrou a ação benéfica dessa associação nos fibroblastos pulpares humanos sem a presença da FTL. Entretanto, torna-se evidente que, no ambiente natural existem vários fatores intrínsecos no sistema de canal radicular de um dente, que em uma pesquisa *in vitro* não são reproduzíveis, tais como temperatura, exsudato inflamatório, vários patógenos, células necrosadas, resposta de cada organismo, portanto sendo necessário um estudo mais amplo *in vivo* para ter dados mais satisfatórios para a inclusão de uma nova medicação intracanal no tratamento endodôntico.

## CONCLUSÃO

A *Aloe vera* permitiu uma maior viabilidade celular em fibroblastos pulpare humanos na presença do hidróxido de cálcio, contudo houve aumento da genotoxicidade nessa associação. No entanto, o hidróxido de cálcio e a FTL apresentaram maior citotoxicidade para fibroblastos pulpare, e o grupo com apenas FTL obteve a maior proliferação celular. A *Aloe Vera* associada a FTL e FTL apresentaram elevada genotoxicidade apesar da baixa citotoxicidade.

## REFERÊNCIAS

- 1- Pablo OV, Estevez R, Heilborn C, Cohenca N. Root anatomy and canal configuration of the permanent mandibular first molar: clinical implications and recommendations. *Quintessence International* 2012, 43:15-27.
- 2- Dotto SR, Travassos RMC, Ferreira R, Santos R, Wagner M. Avaliação da ação antimicrobiana de diferentes medicações usadas em endodontia. *Revista Odonto Ciência* 2006, 21:266-269.
- 3- Lana PEP, Scelza MFZ, Silva LE, Mattos-Guaraldi AL, Hirata Júnior R. Antimicrobial activity of calcium hydroxide pastes on *Enterococcus faecalis* cultivated in root canal systems. *Brazilian Dental Journal* 2009, 20:32-36.
- 4- Lima RKP, Guerreiro-Tanomaru JM, Faria-Junior NB, Tanomaru-Filho M. Effectiveness of calcium hydroxide-based intracanal medicaments against *Enterococcus faecalis*. *International Endodontic Journal* 2012, 45:311-316.
- 5- Oliveira JCM, Alves FRF, Uzeda M, Rôças IN, Siqueira JrJF. Influence of serum and necrotic tissue on the antimicrobial effects of intracanal medicaments. *Brazilian Dental Journal* 2010, 21:295-300.
- 6- Ordinola-Zapata R, Bramante CM, Minotti PG, Cavenago BC, Garcia RB, Bernardineli N, Jaramillo DE, Duarte MAH. Antimicrobial activity of triantibiotic paste, 2% chlorhexidine gel, and calcium hydroxide on an intraoral- infected dentin biofilm model. *Journal of Endodontics* 2013, 39:115-118.
- 7- Lopes HP, Siqueira JrJF. *Endodontia: Biologia e Técnica*. 3ª. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2010.
- 8- Li Y. Biological properties of peroxidecontaining tooth whiteners. *Food and Chemical Toxicology* 1996, 34:887-904.
- 9- Ribeiro DA, Sugui MM, Matsumoto MA, Duarte MA, Marques ME, Salvadori DM. Genotoxicity and cytotoxicity of mineral trioxide aggregate and regular and white Portland cements on Chinese hamster ovary (CHO) cells in vitro. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontology* 2006, 101:258-61.

- 10- Jahromi MZ, Ranjbarian P, Shiravi S. Cytotoxicity Evaluation of Iranian Propolis and Calcium Hydroxide on Dental Pulp Fibroblasts. Journal of Dental Research, Dental Clinics, Dental Prospects 2014, 8:130-133.
- 11- Camargo SEA; Camargo CHR; Hiller K-A; Rode SM, Schweikl H, Schmalz G. Cytotoxicity and genotoxicity of pulp capping materials in two cell lines. International Endodontic Journal 2009, 42:227-237.
- 12- Xu ZZ, Zhang L, Liu T, Park JY, Berta T, Yang R, Serhan CN, Ji RR. Resolvins RvE1 and RvD1 attenuate inflammatory pain via central and peripheral actions. Nature medicine 2010, 16:592-597.
- 13- Albertini R, Villaverde AB, Aimbire F, Salgado MA, Bjordal JM, Alves LP, *et al.* Anti-inflammatory effects of low-level laser therapy (LLLT) with two different red wavelengths (660 nm and 684 nm) in carrageenan-induced rat paw edema. Journal of photochemistry and photobiology B, Biology 2007, 89:50-55.
- 14- Laraia EM, Silva IS, Pereira DM, dosReisFA, Albertini R, de Almeida P, *et al.* Effect of low-level laser therapy (660 nm) on acute inflammation induced by tenotomy of Achilles tendon in rats. Photochemistry and photobiology 2012, 88:1546-1550.
- 15- Mizutani K, Musya Y, Wakae K, Kobayashi T, Tobe M, Taira K, Harada T. A Clinical Study on Serum Prostaglandin E2 with Low-Level Laser Therapy. Photomedicine Laser Surgery 2004, 22:537-539.
- 16- Kiliç N. The effect of *Aloe vera* gel on experimentally induced peritoneal adhesions in rats. Revue de Medecine Veterinaire 2005, 156:409-413.
- 17- Semenoff AS, Bosco AF, Maia D, Ribeiro RV, Aguiar EB, Rocatto GEGD, Cirilo DM, Buzelle SL, Semenoff TADV. Influência do *Aloe vera* e Própolis na contração de feridas em dorso de ratos. Periodontia 2007, 17:5-10.
- 18- Semenoff TAV, Ferreira WRS, Semenoff-segundo A, Biasoli ER. Efetividade in vitro de *Aloe vera* in natura, gel de clorexidina a 0,12% e gel de clorexidina a 2% sobre *Enterococcus faecalis*, Revista Odonto Ciências 2008, 23:283-286.
- 19- International Organization for Standardization. ISO 10993-5: Biological evaluation of medical devices- tests for *in vitro* cytotoxicity. Suíça. 2009, p.34.

- 20- De Mendonça AAM, Souza PPC, Hebling J, Costa CA de S. Cytotoxic effects of hard-setting cements applied on the odontoblast cell line MDPC-23. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontology* 2007, 104:102-108.
- 21- Modareszadeh MR, Chogle SA, Mickel AK, Jin G, Kowsar H, Salamat N, *et al.* Cytotoxicity of set polymer nanocomposite resin root-end filling materials. *International Endodontic Journal* 2011, 44:154-161.
- 22- Bin CV, Valera MC, Camargo SE, Rabelo SB, Silva GO, Balducci I, *et al.* Cytotoxicity and genotoxicity of root canal sealers based on mineral trioxide aggregate. *Journal of Endodontics* 2012, 38:495–500.
- 23- Pereira NA, Eduardo CDP, Matson E, Marques MM. Effect of low-power laser irradiation on cell growth and procollagen synthesis of cultured fibroblasts. *Lasers in Surgery and Medicine* 2002, 31:263-267.
- 24- Damante, CA. Efeito da terapia com laser em baixa intensidade (LILT) na expressão de fatores de crescimento da família FGF por fibroblastos gengivais humanos. *Biblioteca Digital de Teses e Dissertações da USP*. 2007.
- 25- Sepet E, Pinar A, Ilhan B, Ulukapi I, Bilir ATS. Cytotoxic effects of calcium hydroxide and mineral trioxide aggregate on 3T3 fibroblast cell line in vitro. *Quintessence International* 2009, 10:55-61.
- 26- Silva EJNL, Herrera DR, Almeida JF, Ferraz CCR, Gomes BPF, Zaia AA. Evaluation of cytotoxicity and up-regulation of gelatinases in fibroblast cells by three root repair materials. *International Endodontic Journal* 2012, 45:815-820.
- 27- Yoshino P, Nishiyama CK, Cristina K, Santos CF, Sipert CR. In Vitro Cytotoxicity of White MTA , MTA Fillapex<sup>®</sup> and Portland Cement on Human Periodontal Ligament Fibroblasts. *Brazilian Dental Journal* 2013, 24:111-116.
- 28- Hirschman WR, Wheeler M, Bringas JS, Hoen MM. Cytotoxicity comparison of three current direct pulp-capping agents with a new bioceramic root repair putty. *Journal of Endodontics* 2012, 38:385-388.
- 29- Farias MdeP, Almeida RPde, Albuquerque Júnior RLCde, Matos FdeS, Mendonça AAMde, Carvalho NC, Ribeiro MAG. Assessment of intracanal medications cytotoxicity on L929 fibroblast cells. *Bioscience Journal* 2016, 32:566-573.

- 30- Victorino FR, Bramante CM, Zapata RO, Casaroto AR, Garcia RB, Moraes IG, *et al.* Removal efficiency of propolis paste dressing from the root canal. *Journal of Applied Oral Science* 2010, 18:621-624.
- 31- Vianna ME, Zilio DM, Ferraz CC, Zaia AA, de Souza-Filho FJ, Gomes BP. Concentration of hydrogen ions in several calcium hydroxide pastes over different periods of time. *Brazilian Dental Journal* 2009;20:382-388.
- 32- Silveira CF, Cunha RS, Fontana CE, de Martin AS, Gomes BP, Motta RH, *et al.* Assessment of the antibacterial activity of calcium hydroxide combined with chlorhexidine paste and other intracanal medications against bacterial pathogens. *European Journal of Dentistry* 2011, 5:1-7.
- 33- Guerreiro-Tanomaru JM, Chula DG, de Pontes Lima RK, Berbert FL, Tanomaru-Filho M. Release and diffusion of hydroxyl ion from calcium hydroxide-based medicaments. *Dental Traumatology* 2012, 28:320-323.
- 34- Duarte MA, Demarchi AC, Giaxa, MH, Kuga MC, Fraga SC, de Souza LC. Evaluation of pH and calcium ion release of three root canal sealers. *Journal of Endodontics* 2000, 26:389-390.
- 35- Guigand M, Pellen-Mussi P, Le Goff A, Vulcain JM, Bonnaure-Mallet M. Evaluation of the cytocompatibility of three endodontic materials. *Journal of Endodontics* 1999, 25:419-423.
- 36- Barbosa SV, Barroso CMS, Ruiz PA. Cytotoxicity of endodontic irrigants containing calcium hydroxide and sodium lauryl sulphate on fibroblasts derived from mouse L929 cell line. *Brazilian Dental Journal* 2009, 20:118-121.
- 37- Yasuda Y, Tatematsu Y, Fujii S, Maeda H, Akamine A, Torabinejad M, Saito T. Effect of MTAD on the differentiation of osteoblast-like cells. *Journal of Endodontics* 2010, 36:260-263.
- 38- Correa GTB, Veranio GAC, SilvaLE, Hirata Junior R, Coil JM, Scelza MFZ. Cytotoxicity evaluation of two root canal sealers and a commercial calcium hydroxide paste on THP1 cell line by trypan blue assay. *Journal of Applied Oral Science* 2009, 17:457-461.
- 39- Ruparel NB, Teixeira FB, Ferraz CCR, Diogenes A. Direct effect of intracanal medicaments on survival of stem cells of the apical papilla. *Journal of Endodontics* 2012, 38:1372-1375.
- 40- Queiroz AMde, Assed S, Leonardo MR, Nelson-Filho P, Silva LABda. MTA and calcium hydroxide for pulp capping. *Journal of Applied Oral Science* 2005, 13:126–130.



- 41- Ribeiro MAG, Tomaz PJS, Farias MP, PivaMR, Albuquerque Júnior RLC. Effect of laser therapy in inflamed tissue by medications based on iodoform laser therapy in inflamed tissue. American Journal of Applied Sciences 2013, 10:81–88.
- 42- Faleiro CC, Elias STH, Cavalcanti LC, Cavalcanti ASS. O extrato das folhas de babosa, *Aloe vera* na cicatrização de feridas experimentais em pele de ratos, num ensaio controlado por placebo. Natureza on line. 2009;7(2):56- 60.
- 43- Ramos Ad P, Pimentel LC. Ação da Babosa no reparo tecidual e cicatrização. Brazilian Journal of Health 2011, 1:40-48.
- 44- Jittapiromsak N, Sahawat D, Banlunara W, Sangvanich P, Thunyakitpisal P. Acemannan, an extracted product from *Aloe vera*, stimulates dental pulp cell proliferation, differentiation, mineralization, and dentin formation. Tissue Engineering part A 2010, 16:1997-2006.
- 45- Jettanacheawchankit S, Sasithanasate S, Sangvanich P, Banlunara W, Thunyakitpisal P. Acemannan stimulates gingival fibroblast proliferation; expressions of keratinocyte growth factor-1, vascular endothelial growth factor, and type I collagen; and wound healing. Journal of Pharmacological Sciences 2009, 109:525–31.
- 46- Punit F, Sudhindra B, Nilima T, Debaprya P. Evaluation of *Aloe vera* Gel as a Storage Medium in Maintaining the Viability of Periodontal Ligament Cells - An in Vitro Study. Journal of Clinical Pediatric Dentistry Winter 2016, 40:49-52.
- 47- Fenech, M. Important variables that influence base-line micronucleus frequency in cytokinesis-blocked lymphocytes-a biomarker for DNA damage in human populations. Mutation Research Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis Journal 1998, 404:155-165.
- 48- Araldi RP; de Melo TC; Mendes TB; de Sá Júnior PL; Nozima BHN; Ito ET, *et al.* Using the comet and micronucleus assays for genotoxicity studies: A review. Biomed Pharmacother 2015, 72:74–82.
- 49- Loevschall, HA-BD. Effect of low-level diode laser irradiation of human oral mucosa fibroblasts in vitro. Lasers in Surgery and Medicine 1994, 14:347–354.
- 50- Basso FG, Pansani TN, Turrioni APS, Bagnato VS, Heblin J, de Souza Costa C. *In vitro* wound healing improvement by low-level laser therapy application in cultured gingival fibroblasts. International Journal of Dentistry 2012, 719452.

- 51- Riso AADL. Proliferação e viabilidade de fibroblastos após irradiação sequencial em baixa intensidade por dois comprimentos de onda (660 e 780 nm). Autarquia associada à Universidade de São Paulo; 2009.
- 52- Almeida-Lopes L, Rigau J, Zângaro RA, Guidugli-Neto J, Jaeger MM. Comparison of the low level laser therapy effects on cultured human gingival fibroblasts proliferation using different irradiance and same fluence. *Lasers in Surgery and Medicine* 2001, 29:179–184.
- 53- Karu, TI. Molecular mechanism of the therapeutic effect of low intensity laser radiation. *Lasers in the Life Sciences* 1988, 2:53–74.
- 54- Batista VE de S, Olian DD, Mori GG. Diffusion of Hydroxyl Ions from Calcium Hydroxide and *Aloe vera* Pastes. *Brazilian Dental Journal* 2014, 25:212-216.

## 5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Conforme a metodologia utilizada, o tempo influencia na redução da viabilidade celular nos grupos que contêm hidróxido de cálcio (HA, HAA) e FTL (HL, HAL). No entanto, o grupo HL apresentou-se mais citotóxico para células de fibroblasto FP6, e o grupo com apenas FTL obteve maior proliferação celular. Os grupos AL e CL apresentaram elevada genotoxicidade apesar da baixa citotoxicidade. A *Aloe vera* permitiu uma maior viabilidade celular em fibroblastos na presença do hidróxido de cálcio. Torna-se evidente que, no ambiente natural existem vários fatores intrínsecos no sistema de canal radicular de um dente, que em uma pesquisa *in vitro* não são reproduzíveis, tais como temperatura, exsudato inflamatório, vários patógenos, células necrosadas, resposta de cada organismo, portanto sendo necessário um estudo mais amplo *in vivo* para ter dados mais satisfatórios para a inclusão de uma nova medicação intracanal no tratamento endodôntico.

## 6. COMUNICADO DE IMPRESSA

Análise da citotoxicidade e genotoxicidade da *Aloe vera* associada a medicamento endodôntico e fotobiomodulação a laser

A Endodontia é um ramo da Odontologia que apresenta cada vez mais um avanço técnico-científico, essa consiste no tratamento dos sistemas de canais radiculares (SCR) por meio de etapas interdependentes possibilitando que um elemento dental condenado ainda exerça suas funções no Sistema Estomatognático. Entretanto, a utilização de produtos naturais em Odontologia, como a *Aloe vera*, popularmente conhecida como babosa, tem sido justificada pelo uso popular, apresentando-se como uma alternativa de baixo custo, atividades antimicrobiana e anti-inflamatória, portanto, a combinação de recursos naturais com estes medicamentos deve ser avaliada, a fim de investigar novas possibilidades para o desenvolvimento de medicamentos intracanaís para posterior aplicação clínica.

Outro recurso amplamente utilizado na Odontologia é a fotobiomodulação à laser (FTL), a qual apresenta efeitos anti-inflamatórios, analgésicos e de reparação celular. Na Endodontia, esse recurso coadjuvante também favorece o tratamento de canal, podendo minimizar propriedades citotóxicas dos medicamentos intracanaís favorecendo a região do ápice e periápice em dentes com periodontite apical e radiolusência periapical. Na dissertação apresentada pela discente Nayane Chagas Carvalho, orientada pela Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup>. Maria Amália Gonzaga Ribeiro, avaliou-se a citotoxicidade e genotoxicidade, por meio de estudo *in vitro*, da associação da babosa com medicamentos intracanaís e FTL na viabilidade de fibroblastos pulpare humanos (FP6), nos diferentes tempos de exposição 24, 48 e 72hs.

Concluí-se que, a babosa permitiu maior viabilidade celular em fibroblastos na presença do hidróxido de cálcio, bem como apresentando baixa genotoxicidade. Já a FTL permitiu aumento da viabilidade celular quando associada apenas a uma substância. Torna-se evidente que, no ambiente natural existem vários fatores intrínsecos no sistema de canal radicular de um dente, que em uma pesquisa *in vitro* não são reproduzíveis, tais como temperatura, exsudato inflamatório, vários patógenos, células necrosadas, resposta de cada organismo, portanto sendo necessário um estudo mais amplo *in vivo* para ter dados mais satisfatórios para a inclusão de uma nova medicação intracanal no tratamento endodôntico.

Os autores agradecem à FAPITEC/SE (Fundação de Apoio à Pesquisa e Inovação Tecnológica do Estado de Sergipe) e a CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) pelos subsídios obtidos para a realização deste trabalho por meio do PROMOB.

Contatos: Nayane Chagas Carvalho. Universidade Federal de Sergipe, Hospital Universitário. Rua Cláudio Batista, s/n. Bairro: Sanatório. Aracaju, Sergipe, Brasil. CEP: 49060-100. Email: [nayanecc@gmail.com](mailto:nayanecc@gmail.com).

## 7. REFERÊNCIAS

Albertini R, Villaverde AB, Aimbire F, Salgado MA, Bjordal JM, Alves LP, *et al.* Anti-inflammatory effects of low-level laser therapy (LLLT) with two different red wavelengths (660 nm and 684 nm) in carrageenan-induced rat paw edema. *Journal of photochemistry and photobiology B, Biology* 2007, 89:50-55.

Almeida-Lopes L, Rigau J, Zângaro RA, Guidugli-Neto J, Jaeger MM. Comparison of the low level laser therapy effects on cultured human gingival fibroblasts proliferation using different irradiance and same fluence. *Lasers in Surgery and Medicine* 2001, 29:179–184.

Araldi RP; de Melo TC; Mendes TB; de Sá Júnior PL; Nozima BHN; Ito ET, *et al.* Using the comet and micronucleus assays for genotoxicity studies: A review. *Biomed Pharmacother* 2015, 72:74–82.

Barbosa SV, Barroso CMS, Ruiz PA. Cytotoxicity of endodontic irrigants containing calcium hydroxide and sodium lauryl sulphate on fibroblasts derived from mouse L929 cell line. *Brazilian Dental Journal* 2009, 20:118-121.

Basso FG, Pansani TN, Turrioni APS, Bagnato VS, Heblin J, de Souza Costa C. *In vitro* wound healing improvement by low-level laser therapy application in cultured gingival fibroblasts. *International Journal of Dentistry* 2012, 719452.

Batista VE de S, Olian DD, Mori GG. Diffusion of Hydroxyl Ions from Calcium Hydroxide and *Aloe vera* Pastes. *Brazilian Dental Journal* 2014, 25:212-216.

Bin CV, Valera MC, Camargo SE, Rabelo SB, Silva GO, Balducci I, *et al.* Cytotoxicity and genotoxicity of root canal sealers based on mineral trioxide aggregate. *Journal of Endodontics* 2012, 38:495–500.

Camargo SEA; Camargo CHR; Hiller K-A; Rode SM, Schweikl H, Schmalz G. Cytotoxicity and genotoxicity of pulp capping materials in two cell lines. *International Endodontic Journal* 2009, 42:227-237.

Cavalcanti YW, Almeida LdeFde, Costa MMTdeM, Padilha WWN. Antimicrobial activity and pH evaluation of Calcium Hydroxide associated with natural products. *Brazilian Dental Science* 2010, 13:49-54.

Cornélio ALG, Salles LP, Paz MC, Cirelli JA, Guerreiro-Tanomaru JM, Tanomaru-Filho M. Citotoxicity of Portland cement with radiopacifying agents: A cell death study. *Journal of Endodontics* 2011, 37:203-210.

Correa GTB, Veranio GAC, SilvaLE, Hirata Junior R, Coil JM, Scelza MFZ. Cytotoxicity evaluation of two root canal sealers and a commercial calcium hydroxide paste on THP1 cell line by trypan blue assay. *Journal of Applied Oral Science* 2009, 17:457-461.

Damante, CA. Efeito da terapia com laser em baixa intensidade (LILT) na expressão de fatores de crescimento da família FGF por fibroblastos gengivais humanos. *Biblioteca Digital de Teses e Dissertações da USP*. 2007.

De Mendonça AAM, Souza PPC, Hebling J, Costa CA de S. Cytotoxic effects of hard-setting cements applied on the odontoblast cell line MDPC-23. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontology* 2007, 104:102-108.

Dotto SR, Travassos RMC, Ferreira R, Santos R, Wagner M. Avaliação da ação antimicrobiana de diferentes medicações usadas em endodontia. *Revista Odonto Ciência* 2006, 21:266-269.

Duarte MA, Demarchi AC, Giaxa, MH, Kuga MC, Fraga SC, de Souza LC. Evaluation of pH and calcium ion release of three root canal sealers. *Journal of Endodontics* 2000, 26:389-390.

Faleiro CC, Elias STH, Cavalcanti LC, Cavalcanti ASS. O extrato das folhas de babosa, *Aloe vera* na cicatrização de feridas experimentais em pele de ratos, num ensaio controlado por placebo. *Natureza on line*. 2009;7(2):56- 60.

Farias MdeP, Almeida RPde, Albuquerque Júnior RLCde, Matos FdeS, Mendonça AAMde, Carvalho NC, Ribeiro MAG. Assessment of intracanal medications cytotoxicity on L929 fibroblast cells. *Bioscience Journal* 2016, 32:566-573.

Fé JLM, Coelho CA, Damascena GM, Soares IMV, Alves FR, Santos IMSP, Carvalho CMRS. *Aloe vera* as vehicle to mineral trioxide aggregate: study in bone repair. *Revista de Odontologia da UNESP* 2014, 43:299-304.

Fenech, M. Important variables that influence base-line micronucleus frequency in cytokinesis-blocked lymphocytes-a biomarker for DNA damage in human populations. *Mutation Research Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis Journal* 1998, 404:155-165.

Gomes, C. Livro: *Aloe vera* (babosa) - Planta Milenar. 2012. [acesso 02 set 2014]. Disponível em: [www.harmonianatureza.com.br](http://www.harmonianatureza.com.br).

Guerreiro-Tanomaru JM, Chula DG, de Pontes Lima RK, Berbert FL, Tanomaru-Filho M. Release and diffusion of hydroxyl ion from calcium hydroxide-based medicaments. *Dental Traumatology* 2012, 28:320-323.

Guigand M, Pellen-Mussi P, Le Goff A, Vulcain JM, Bonnaure-Mallet M. Evaluation of the cytocompatibility of three endodontic materials. *Journal of Endodontics* 1999, 25:419-423.

Hirschman WR, Wheeler M, Bringas JS, Hoen MM. Cytotoxicity comparison of three current direct pulp-capping agents with a new bioceramic root repair putty. *Journal of Endodontics* 2012, 38:385-388.



International Organization for Standardization. ISO 10993-5: Biological evaluation of medical devices- tests for in vitro cytotoxicity. Suíça. 2009, p.34.

Jahromi MZ, Ranjbarian P, Shiravi S. Cytotoxicity Evaluation of Iranian Propolis and Calcium Hydroxide on Dental Pulp Fibroblasts. Journal of Dental Research, Dental Clinics, Dental Prospects 2014, 8:130-133.

Jettanacheawchankit S, Sasithanasate S, Sangvanich P, Banlunara W, Thunyakitpisal P. Acemannan stimulates gingival fibroblast proliferation; expressions of keratinocyte growth factor-1, vascular endothelial growth factor, and type I collagen; and wound healing. Journal of Pharmacological Sciences 2009, 109:525–31.

Jittapiromsak N, Sahawat D, Banlunara W, Sangvanich P, Thunyakitpisal P. Acemannan, an extracted product from *Aloe vera*, stimulates dental pulp cell proliferation, differentiation, mineralization, and dentin formation. Tissue Engineering part A 2010, 16:1997-2006.

Júnior JP. Análise do pH de pastas endodônticas associadas à *Aloe vera*. Trabalho de conclusão de curso de graduação em Odontologia. Universidade Federal de Sergipe. Aracaju/SE - Brasil. 2015.

Karu, TI. Molecular mechanism of the therapeutic effect of low intensity laser radiation. Lasers in the Life Sciences 1988, 2:53–74.

Kiliç N. The effect of *Aloe vera* gel on experimentally induced peritoneal adhesions in rats. Revue de Medecine Veterinaire 2005, 156:409-413.

Lana PEP, Scelza MFZ, Silva LE, Mattos-Guaraldi AL, Hirata Júnior R. Antimicrobial activity of calcium hydroxide pastes on *Enterococcus faecalis* cultivated in root canal systems. Brazilian Dental Journal 2009, 20:32-36.

Laraia EM, Silva IS, Pereira DM, dosReisFA, Albertini R, de Almeida P, *et al.* Effect of low-level laser therapy (660 nm) on acute inflammation induced by tenotomy of Achilles tendon in rats. *Photochemistry and photobiology* 2012, 88:1546-1550.

Leonardo MR, Silva RE, Silva LA. Penetrabilidade do curativo de demora no sistema de canal radicular. Avaliação de diferentes produtos. *Revista Gaúcha de Odontologia* 1993, 41:199-203.

Li Y. Biological properties of peroxidecontaining tooth whiteners. *Food and Chemical Toxicology* 1996, 34:887-904.

Lima RKP, Guerreiro-Tanomaru JM, Faria-Junior NB, Tanomaru-Filho M. Effectiveness of calcium hydroxide-based intracanal medicaments against *Enterococcus faecalis*. *International Endodontic Journal* 2012, 45:311-316.

Loevschall, HA-BD. Effect of low-level diode laser irradiation of human oral mucosa fibroblasts in vitro. *Lasers in Surgery and Medicine* 1994, 14:347–354.

Lopes HP, Siqueira JrJF. *Endodontia: Biologia e Técnica*. 3ª. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2010.

Mizutani K, Musya Y, Wakae K, Kobayashi T, Tobe M, Taira K, Harada T. A Clinical Study on Serum Prostaglandin E2 with Low-Level Laser Therapy. *Photomedicine Laser Surgery* 2004, 22:537-539.

Modareszadeh MR, Chogle SA, Mickel AK, Jin G, Kowsar H, Salamat N, *et al.* Cytotoxicity of set polymer nanocomposite resin root-end filling materials. *International Endodontic Journal* 2011, 44:154-161.

Oliveira JCM, Alves FRF, Uzeda M, Rôças IN, Siqueira JrJF. Influence of serum and necrotic tissue on the antimicrobial effects of intracanal medicaments. *Brazilian Dental Journal* 2010, 21:295-300.

Ordinola-Zapata R, Bramante CM, Minotti PG, Cavenago BC, Garcia RB, Bernardineli N, Jaramillo DE, Duarte MAH. Antimicrobial activity of triantibiotic paste, 2% chlorhexidine gel, and calcium hydroxide on an intraoral- infected dentin biofilm model. *Journal of Endodontics* 2013, 39:115-118.

Pablo OV, Estevez R, Heilborn C, Cohenca N. Root anatomy and canal configuration of the permanent mandibular first molar: clinical implications and recommendations. *Quintessence International* 2012, 43:15-27.

Pallotta RC, Ribeiro MS, Machado MEL. Determination of minimum inhibitory concentration of four medicaments used as intracanal medication. *Australian Endodontic Journal* 2007, 33:107-111.

Passos SM. Microbiologia das Infecções Endodônticas. Monografia para a obtenção do grau de Especialista em Endodontia. Faculdade de Odontologia, Belo Horizonte. 2014.

Pereira NA, Eduardo CDP, Matson E, Marques MM. Effect of low-power laser irradiation on cell growth and procollagen synthesis of cultured fibroblasts. *Lasers in Surgery and Medicine* 2002, 31:263-267.

Punit F, Sudhindra B, Nilima T, Debaprya P. Evaluation of *Aloe vera* Gel as a Storage Medium in Maintaining the Viability of Periodontal Ligament Cells - An in Vitro Study. *Journal of Clinical Pediatric Dentistry* Winter 2016, 40:49-52.

Queiroz AMde, Assed S, Leonardo MR, Nelson-Filho P, Silva LABda. MTA and calcium hydroxide for pulp capping. *Journal of Applied Oral Science* 2005, 13:126–130.

Ramos Ad P, Pimentel LC. Ação da Babosa no reparo tecidual e cicatrização. *Brazilian Journal of Health* 2011, 1:40-48.

Ribeiro DA, Sugui MM, Matsumoto MA, Duarte MA, Marques ME, Salvadori DM. Genotoxicity and cytotoxicity of mineral trioxide aggregate and regular and white Portland cements on Chinese hamster ovary (CHO) cells in vitro. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontology* 2006, 101:258-61.

Ribeiro MAG, Tomaz PJS, Farias MP, PivaMR, Albuquerque Júnior RLC. Effect of laser therapy in inflamed tissue by medications based on iodoform laser therapy in inflamed tissue. *American Journal of Applied Sciences* 2013, 10:81–88.

Riso AADL. Proliferação e viabilidade de fibroblastos após irradiação sequencial em baixa intensidade por dois comprimentos de onda (660 e 780 nm). Autarquia associada à Universidade de São Paulo. 2009.

Ruparel NB, Teixeira FB, Ferraz CCR, Diogenes A. Direct effect of intracanal medicaments on survival of stem cells of the apical papilla. *Journal of Endodontics* 2012, 38:1372-1375.

Semenoff AS, Bosco AF, Maia D, Ribeiro RV, Aguiar EB, Rocatto GEGD, Cirilo DM, Buzelle SL, Semenoff TADV. Influência do *Aloe vera* e Própolis na contração de feridas em dorso de ratos. *Periodontia* 2007, 17:5-10.

Semenoff TAV, Ferreira WRS, Semenoff-segundo A, Biasoli ER. Efetividade in vitro de *Aloe vera* in natura, gel de clorexidina a 0,12% e gel de clorexidina a 2% sobre *Enterococcus faecalis*, *Revista Odonto Ciências* 2008, 23:283-286.

Sepet E, Pinar A, Ilhan B, Ulukapi I, Bilir ATS. Cytotoxic effects of calcium hydroxide and mineral trioxide aggregate on 3T3 fibroblast cell line in vitro. *Quintessence International* 2009, 10:55-61.

Silva AR, Leal PM. Emprego clínico do iodofórmio em endodontia. MG: Belo Horizonte. 2012.

Silva EJNL, Herrera DR, Almeida JF, Ferraz CCR, Gomes BPF, Zaia AA. Evaluation of cytotoxicity and up-regulation of gelatinases in fibroblast cells by three root repair materials. *International Endodontic Journal* 2012, 45:815-820.

Silveira CF, Cunha RS, Fontana CE, de Martin AS, Gomes BP, Motta RH, *et al.* Assessment of the antibacterial activity of calcium hydroxide combined with chlorhexidine paste and other intracanal medications against bacterial pathogens. *European Journal of Dentistry* 2011, 5:1-7.

Tronstad L, Andreasen JO, Hasselgren G, Kristerson L, Riis I. pH changes in dental tissues after root canal filling with calcium hydroxide. *Journal of Endodontics* 1981, 7:17-21.

Vianna ME, Zilio DM, Ferraz CC, Zaia AA, de Souza-Filho FJ, Gomes BP. Concentration of hydrogen ions in several calcium hydroxide pastes over different periods of time. *Brazilian Dental Journal* 2009;20:382-388.

Victorino FR, Bramante CM, Zapata RO, Casaroto AR, Garcia RB, Moraes IG, *et al.* Removal efficiency of propolis paste dressing from the root canal. *Journal of Applied Oral Science* 2010, 18:621-624.

Xu ZZ, Zhang L, Liu T, Park JY, Berta T, Yang R, Serhan CN, Ji RR. Resolvins RvE1 and RvD1 attenuate inflammatory pain via central and peripheral actions. *Nature medicine* 2010, 16:592-597.

Yasuda Y, Tatematsu Y, Fujii S, Maeda H, Akamine A, Torabinejad M, Saito T. Effect of MTAD on the differentiation of osteoblast-like cells. *Journal of Endodontics* 2010, 36:260-263.

Yoshino P, Nishiyama CK, Cristina K, Santos CF, Sipert CR. In Vitro Cytotoxicity of White MTA , MTA Fillapex<sup>®</sup> and Portland Cement on Human Periodontal Ligament Fibroblasts. Brazilian Dental Journal 2013, 24:111-116.

## APÊNDICE I

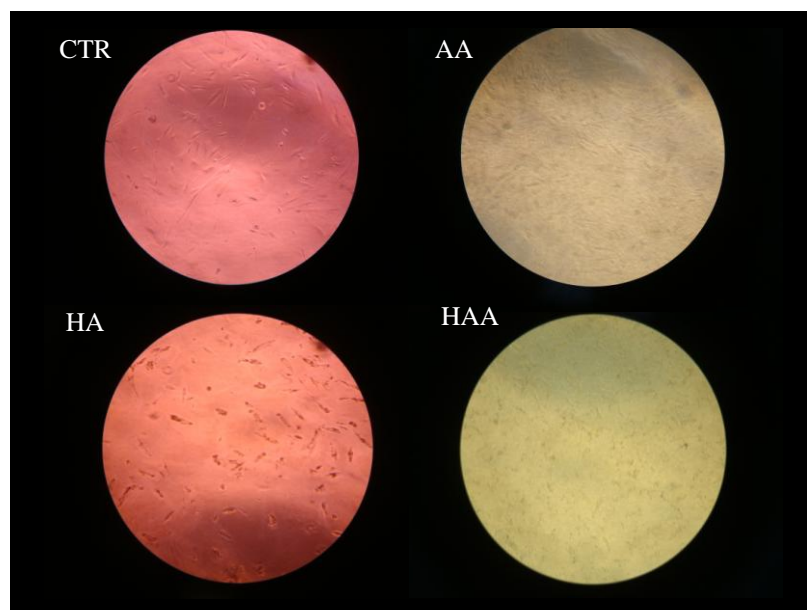


Figura 1. Imagem dos poços com fibroblastos pulpare humanos de microscópio óptico invertido com aumento de 200X em 24 h.

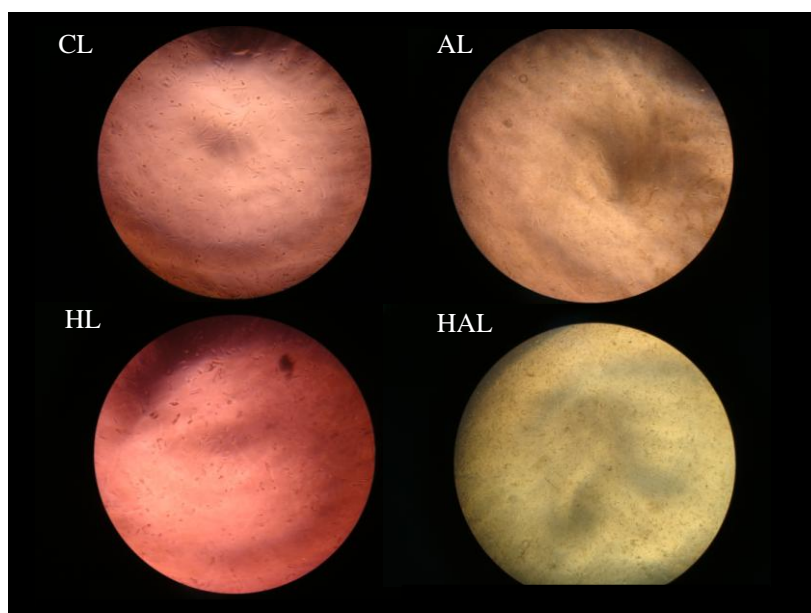


Figura 2. Imagem dos poços irradiados com fibroblastos pulpare humanos de microscópio óptico invertido com aumento de 100X em 24 h.

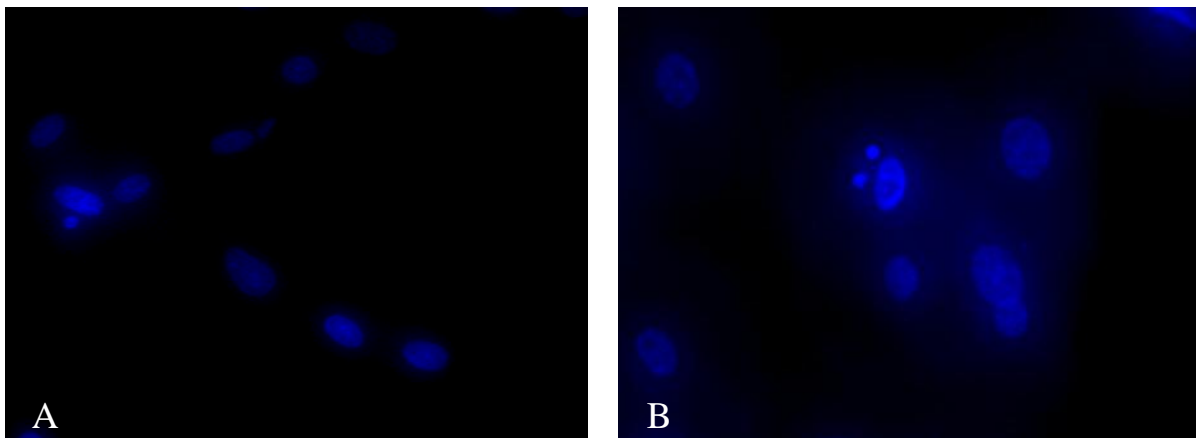


Figura 3. A, B: Imagem dos micronúcleos em microscópio de fluorescência com aumento de 400X em 24 h.

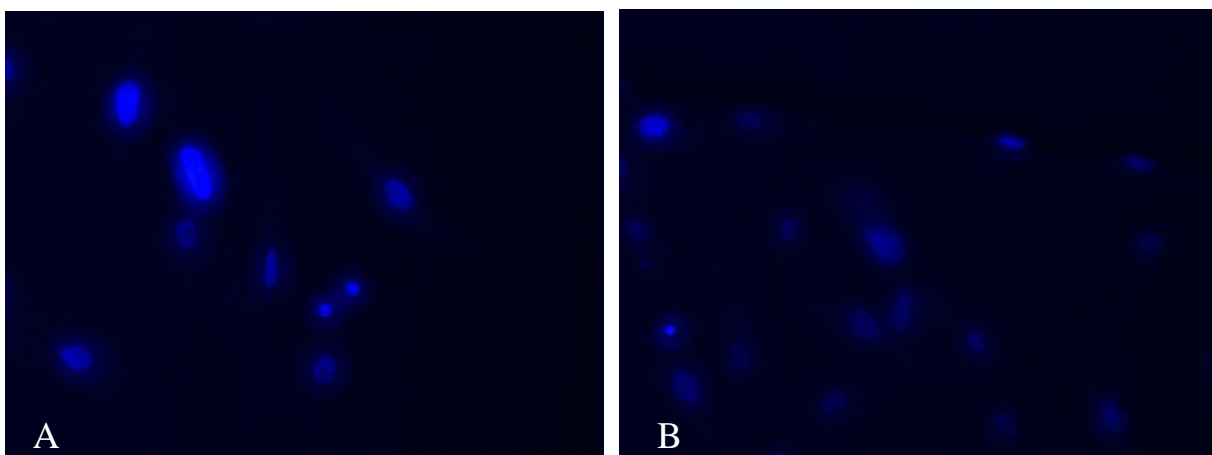


Figura 4. A, B: Imagem de células com fragmentação nuclear por apoptose em microscópio de fluorescência com aumento de 400X em 24 h.



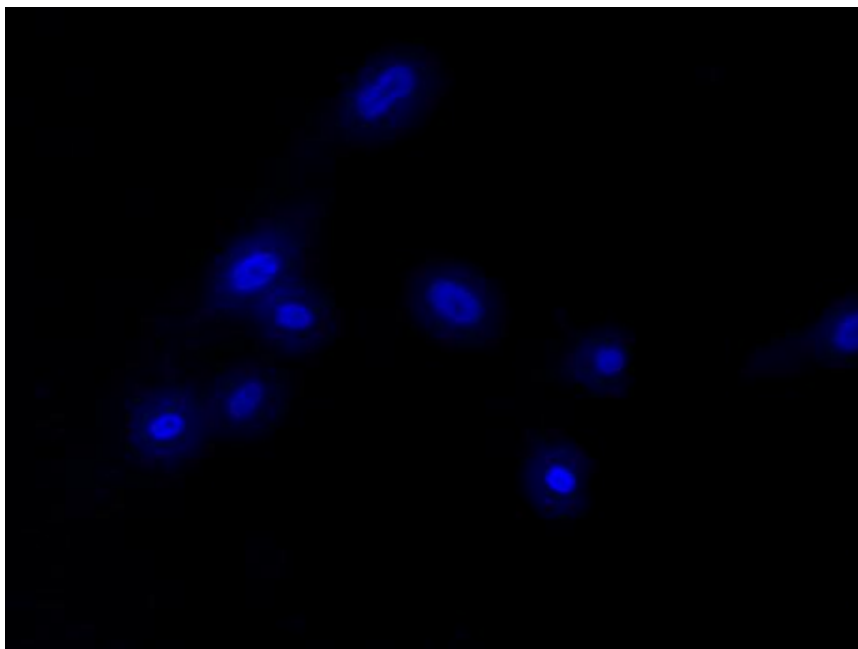


Figura 5. Imagem de células em divisão celular em microscópio de fluorescência com aumento de 400X em 24 h.